

N^5 -substituierte Paullone als Hemmstoffe der Trypanothionsynthetase

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Ricarda Selina Korn
aus Siegen

1. Referent: Prof. Dr. C. Kunick

2. Referent: Prof. Dr. Ingo Ott

eingereicht am: 11.11.2013

mündliche Prüfung (Disputation) am: 13.02.2014

Druckjahr 2014

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Korn, R. S., Koch, O., Abad Dar, M., Erdmann, H., Benítez, D., Charquero, D., Hölscher, C., Comini, M., Kunick, C.: Synthesis and antiparasitic activity of N^5 -substituted paullones. (Poster) DPhG-Jahrestagung, Freiburg (2013).

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 2010 bis November 2013 am Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter der Anleitung von

Herrn Professor Dr. Conrad Kunick

dem ich an dieser Stelle meinen Dank für die Überlassung des Themas, die Betreuung und die Unterstützung während des Projektes aussprechen möchte.

Mein besonderer Dank gilt auch

Herrn Professor Dr. Ingo Ott

für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	- 1 -
1.1	Leishmaniose	- 2 -
1.2	Trypanosomiasis	- 7 -
1.2.1	Chagas	- 8 -
1.2.2	Humane afrikanische Trypanosomiasis	- 10 -
1.3	Das Trypanothionsystem.....	- 13 -
1.4	Wirkstoffentwicklung.....	- 18 -
1.5	Trypanothionsynthetase	- 19 -
2	Motivation und Aufgabenstellung	- 23 -
3	Synthese und Charakterisierung	- 29 -
3.1	Paullonsynthese	- 29 -
3.2	Massenspektrometrische Besonderheiten synthetisierter Paullone.....	- 32 -
3.3	N^5 -Substitution am 3-Chlor-Kenpaullon.....	- 38 -
4	Biologische Evaluierung	- 67 -
4.1	Vitalitäts- und Proliferationsuntersuchungen	- 67 -
4.1.1	MTT-Assay an <i>T. cruzi</i> -Epimastigoten	- 67 -
4.1.2	Durchflusszytometrieuntersuchungen mit infektiösen <i>T. b. brucei</i>	- 69 -
4.2	Inhibition der Trypanothionsynthetasen.....	- 74 -
4.3	Zytotoxizitätsuntersuchungen.....	- 82 -
5	Zusammenfassung.....	- 85 -
6	Summary	- 89 -
7	Experimentelle Methoden.....	- 93 -

7.1	Analytische Methoden	- 93 -
7.2	Chemikalien.....	- 96 -
7.3	Synthesen und analytische Daten	- 97 -
7.4	Biologische Testungen	- 138 -
7.4.1	Zytotoxizitätsmessungen.....	- 138 -
7.4.2	Expression, Reinigung und Aktivitätsassay der Trypanothionsynthetasen (<i>LiTryS</i> , <i>TbTryS</i> und <i>TcTryS</i>).....	- 144 -
8	Literaturverzeichnis	- 149 -

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ADP	Adenosindiphosphat
aGSH	aktiviertes Glutathion
ATP	Adenosintriphosphat
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BPO	Dibenzoylperoxid
<i>C.</i>	<i>Crithidia</i>
<i>C. f.</i>	<i>Crithidia fasciculata</i>
CHN	Elementaranalyse
CI	Zellindex
Cys	Cystein
DC	Dünnschichtchromatographie
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>d</i> ₆ -DMSO	deuteriertes Dimethylsulfoxid
DNDi	<i>Drugs for Neglected Diseases initiative</i>
dSAM	decarboxyliertes S-Adenosylmethionin
<i>Ec</i>	<i>Escherichia coli</i>
FCS	fetales Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i> - Vorwärtsstreulicht

Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GSH	Glutathion
GSH1	γ -Glutamylcysteinsynthetase
GSH2	Glutathionsynthetase
Gsp	Glutathionylspermidin
GspS	Glutathionylspermidinsynthetase
HAT	<i>human african trypanosomiasis</i> – Afrikanische Schlafkrankheit
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IR	Infrarot
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
LG/1%PS	L-Glutamin/1%Penicillin-Streptomycin
<i>Lm</i>	<i>Leishmania major</i>
LPS	Lipopolysaccharid
2-ME	Mercaptoethanol
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, reduzierte Form
NADP ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, oxidierte Form
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NMR	Kernresonanzspektroskopie
ODC	Ornithindecaboxylase
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
Phe	Phenylalanin
PTC	Phasentransferkatalyse
PyBOP	Benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
RT	Raumtemperatur

SDS	Natriumdodecylsulfat
Smp.	Schmelzpunkt
SpdS	Spermidinsynthetase
SSC	<i>side scatter</i> - Seitwärtsstreulicht
<i>T.</i>	<i>Trypanosoma</i>
<i>T. b.</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
t_M	Totzeit
t_N	Gesamtreentionszeit
TryR	Trypanothionreduktase
TryS	Trypanothionsynthetase
TS ₂	Trypanothiondisulfid
T(SH) ₂	Trypanothion
TXN	Tryparedoxin
TXNPx	Tryparedoxinperoxidase
UV	Ultraviolett
WHO	<i>world health organization</i> - Weltgesundheitsorganisation
Zers.	Zersetzung

1 Einleitung

„Neglected tropical diseases continue to cause significant morbidity and mortality in the developing world. Yet, of the 1,556 new drugs approved between 1975 and 2004, only 21 (1.3%) were specifically developed for tropical diseases, [...], even though these diseases account for 11.4% of the global disease burden.“¹

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) listet 17 vernachlässigte Tropenkrankheiten, von denen weltweit mehr als eine Milliarde Menschen betroffen sind². Dies entspricht 10-15% der globalen Population und mehr als 65% der Population in den Entwicklungsländern^{1,3}.

Unter den 17 von der WHO gelisteten Krankheiten befinden sich Leishmaniose und Trypanosomiasis. Ausgelöst werden diese Infektionskrankheiten von protozoischen Parasiten der Familie *Trypanosomatidae* der Gattung *Leishmania* bzw. *Trypanosoma*⁴⁻⁸. Da sich die Übertragung der Parasiten auf Grund des natürlichen Lebensraumes der übertragenden Spezies hauptsächlich in ländlichen Gebieten der Dritten Welt fokussiert, wird die Entwicklung neuer Arzneistoffe gegen diese parasitär ausgelösten Krankheitsbilder wie Leishmaniose, Chagas oder die afrikanische Schlafkrankheit (HAT) von den rein kommerziell orientierten Pharmaindustrien der Ersten Welt stark vernachlässigt⁹. Nur ca. 1.3% der im Zeitraum von 1975 bis 2004 hergestellten Wirkstoffe wurden speziell für die Behandlung von Tropenkrankheiten entwickelt¹. Aktuell verfügbare Therapiemöglichkeiten sind wegen zu hoher Kosten, nicht akzeptabler Toxizitäten, geringer Effizienzen und zunehmender Resistenzen begrenzt. Aus diesem Grund werden dringend neue Ansätze zur medikamentösen Behandlung benötigt^{2,10}.

1.1 Leishmaniose

Bei der Leishmaniose handelt es sich um eine durch protozoische Parasiten der Gattung *Leishmania* ausgelöste Infektionskrankheit. Die Erreger werden durch infizierte Sandmücken übertragen, die in tropischen und subtropischen Regionen der Erde vorkommen. Die Verbreitung der Leishmaniose ist an den natürlichen Lebensraum der Insekten gekoppelt, wobei sich dieser auf Grund der Klimaerwärmung stetig ausbreitet^{5, 7}. Weltweit leben laut DNDi (*Drugs for Neglected Diseases initiative*) zurzeit schätzungsweise 350 Millionen Menschen in 98 Ländern mit dem Risiko mit Leishmanien infiziert zu werden. Die WHO spricht von ca. 1.6 Millionen neuen Infektionen jährlich, darunter sind 500 000 Fälle der schwerwiegendsten Form, der viszerale Leishmaniose¹¹⁻¹³.

Leishmanien sind geißeltragende einzellige Organismen, welche als Flagellaten bezeichnet werden. Sie verfügen über einen Zellkern und ein einzigartiges DNA-beinhaltendes Organell, den Kinetoplasten, welcher sich in räumlicher Nähe zur Geißel anordnet. Flagellaten treten im Verlauf ihres Lebenszyklus in unterschiedlichen Morphologien auf, welche sich in der Form der Zelle, der Lokalisation des Kinetoplasten in Bezug auf den Zellkern und der Ausprägung der Geißeln unterscheiden. Bei Leishmanien handelt es sich um die amastigote und die promastigote Form. Amastigoten verfügen über eine reduzierte Geißel, welche aber nicht an der Zelloberfläche hervortritt. Promastigoten besitzen einen im Vergleich zu Amastigoten länglichen Grundkörper und eine ausgeprägte, gut sichtbare Geißel (siehe Abbildung 1)¹⁴⁻¹⁵.

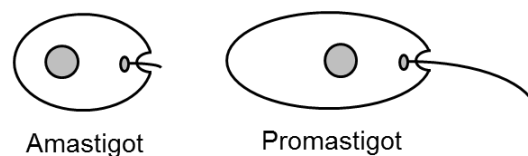


Abbildung 1: Morphologien von Leishmanien¹⁴⁻¹⁵.

Zur Veranschaulichung der Übertragungswege und des Lebenszyklus der Leishmanien sind diese in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Beim Stich einer infizierten weiblichen Sandmücke werden mit dem Speichel Promastigoten auf den Wirt/Menschen übertragen. Dort werden sie von Makrophagen phagozytiert und innerhalb dieser Zellen zu Amastigoten umgewandelt. Im Anschluss an eine Vermehrung der intrazellulären Amastigoten findet eine Makrophagenlyse statt, wobei amastigote Leishmanien freigesetzt werden. Diese können weitere Makrophagen infizieren, in denen sie sich erneut durch Zellteilung vermehren. Nimmt nun die Sandmücke eine Blutmahlzeit des infizierten Wirtes zu sich, beinhaltet diese mit Amastigoten beladene Makrophagen. Nach Freisetzung der Amastigoten bei der Makrophagenlyse in der Sandmücke werden die Leishmanien extrazellulär im Verdauungstrakt des Vektors in Promastigoten umgewandelt. Dort vermehren sich die Promastigoten und migrieren in den Stechrüssel. Eine erneute Blutmahlzeit würde dann wieder zur Übertragung von Erregern auf einen weiteren Wirt führen, wodurch sich der Kreislauf schließt (siehe Abbildung 2) ^{5, 15-17}.

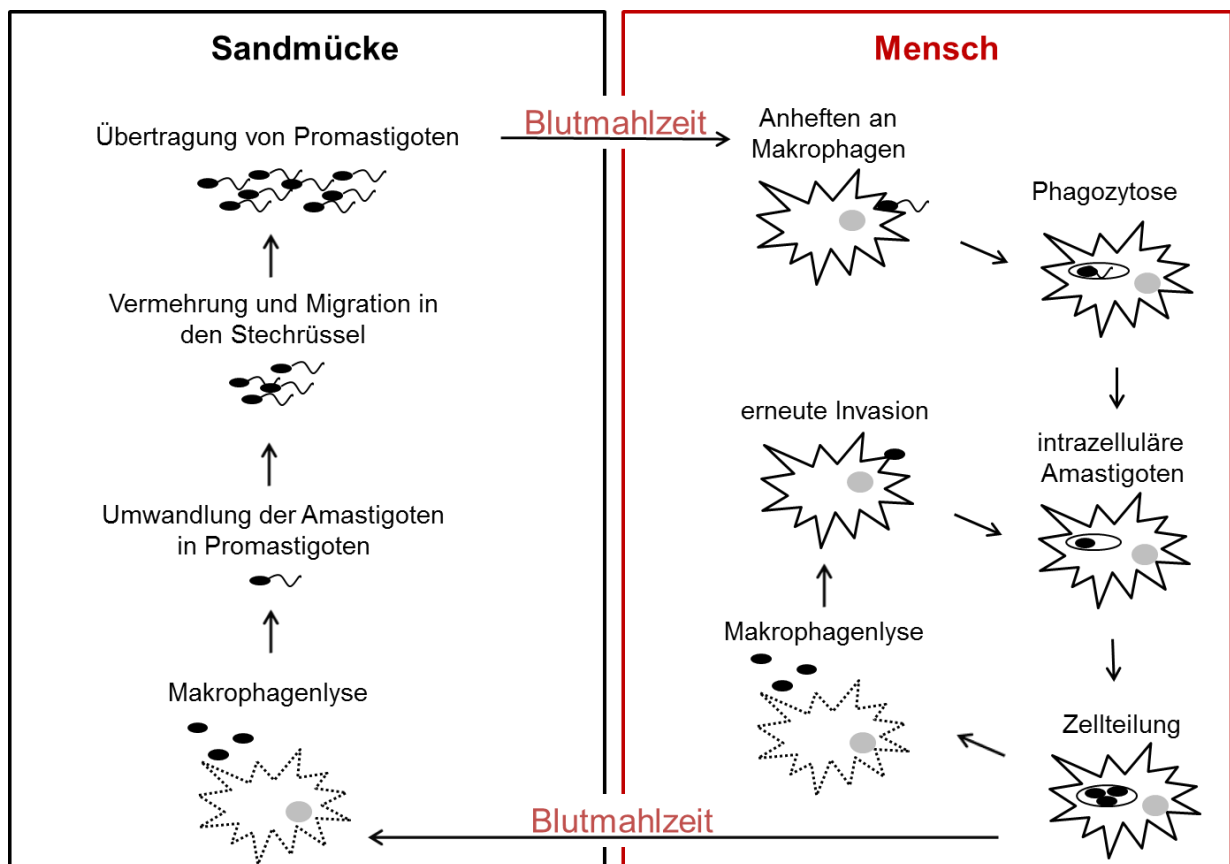


Abbildung 2: Übertragung und Lebenszyklus von Leishmanien ^{5, 16}.

Abhängig von der Erregerart und der Immunantwort des infizierten Individuums verlaufen Infektionen unterschiedlich schwerwiegend. Es wird zwischen drei Hauptformen der Leishmaniose unterschieden^{5, 12, 18-19}:

- Die kutane Leishmaniose, auch als Orientbeule bezeichnet, betrifft ausschließlich die Haut und ist die am häufigsten auftretende Form. Die um die Einstichstelle entstehende entzündliche Geschwürbildung heilt in der Regel von selbst aus, hinterlässt aber auffällige Narben. Bei Patienten mit Immundefekten kann die diffuse kutane Leishmaniose beobachtet werden. Dabei handelt es sich um eine schwerwiegende Form der kutanen Leishmaniose, bei welcher sich die Parasiten über die Haut ausbreiten und es zu einem verstreuten Auftreten mehrerer Geschwüre kommt. Diese müssen chemotherapeutisch behandelt werden, sprechen aber sehr schlecht bis gar nicht auf die Therapien an.
- Bei der mukokutanen Leishmaniose kommt es zur Dissemination der Parasiten aus den Einstichstellen in die Schleimhäute des Nasen-Rachen-Raumes. Unbehandelt kann die Infektion zu einer chronischen Erkrankung führen, wodurch Nase, Ohren, Lippen und Gaumen zerstört werden können. Neben der durch Entstellungen bedingten sozialen Ausgrenzung kann die mukokutane Leishmaniose bei schwerem Verlauf durch Sekundärinfektionen, Schluckunfähigkeit und Kachexie zum Tod führen.
- Die schwerste Form der Leishmaniose ist die viszerale Form, auch Kala Azar, Dum-Dum-Fieber oder Kalkuttafieber genannt. Nach der Übertragung der Parasiten tritt zunächst das von der kutanen Leishmaniose bekannte Geschwür auf. Ausgehend davon breiten sich die Erreger auf die Organe aus. Hauptsächlich betroffen sind die Lymphknoten, die Milz, die Leber und das Knochenmark. Unbehandelt verläuft die viszerale Leishmaniose meist tödlich. Die Patienten sterben innerhalb von sechs Monaten bis zwei Jahren an inneren Blutungen, Anämie oder auf Grund von bakteriellen Sekundärinfektionen. Jährlich erliegen ca. 50 000 Menschen dieser Form der Leishmaniose.

Die derzeitigen medikamentösen Therapiemöglichkeiten (siehe Abbildung 3) sind auf Grund variierender Nachteile unzureichend. Die pentavalente Antimonverbindung Natrium-Stibogluconat (**1**) ist seit den 1940er Jahren das bevorzugte Medikament zur Behandlung der Leishmaniose. Durch eine Reduktion zur dreiwertigen Form entsteht die wirksame Spezies. Die Struktur der Verbindung **1** und der genaue Wirkmechanismus sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Neben der notwendigen parenteralen Applikation und einer langen Therapiedauer treten kardiale und abdominale Nebenwirkungen auf. Der größte Nachteil dieser Therapie ist eine ausgeprägte Neigung zu Resistenzen, welche insbesondere im indischen Bundesstaat Bihar auftritt. Aus diesem Grund kann Natrium-Stibogluconat dort nicht mehr eingesetzt werden. In Gebieten, in denen Resistenzen gegenüber **1** zu beobachten sind, ist Amphotericin B (**2**) das Mittel der Wahl. Durch die Interaktion des Wirkstoffes mit dem Zellmembranbaustein Ergosterol aus Leishmanien, welcher im Menschen nicht vorhanden ist, wird der Zelltod eingeleitet. Neben der notwendigen parenteralen Applikation stellt die beobachtete Nephrotoxizität einen nachteiligen Effekt dar. Das größte Problem bei der Anwendung von Amphotericin B sind sehr hohe Therapiekosten, wodurch das Medikament **2** trotz seiner guten Wirksamkeit nur begrenzt einsetzbar ist. Der oral applizierbare, ursprünglich als Krebstherapeutikum entwickelte Arzneistoff Miltefosin (**3**) ist der neueste Wirkstoff in der Leishmaniosetherapie. Auch in diesem Fall sind die Therapiekosten hoch und zusätzlich die Therapiedauer von 28 Tagen sehr lang. Neben teratogenen und gastrointestinalen Nebenwirkungen werden auch hohe Rückfallquoten verzeichnet, was möglicherweise ein Indiz für die Ausbildung von Resistenzen ist. Die Therapiemöglichkeit **4**, das Pentamidin, wird intramuskulär oder intravenös verabreicht. Der Einsatz dieses Arzneistoffes ist auf Grund renaler Toxizität, hypotensiver Krisen und metabolischer Störungen eingeschränkt. Paromomycin (**5**) ist in Indien seit 2006 als Arzneistoff gegen viszerale Leishmaniose zugelassen. Es wird intramuskulär verabreicht, was Schmerzen an der Injektionsstelle verursacht. Die vergleichsweise leichten Nebenwirkungen treten aber neben den Vorteilen in Form von geringen Kosten und einer kurzen Therapiedauer in den Hintergrund ^{7, 12, 17}.

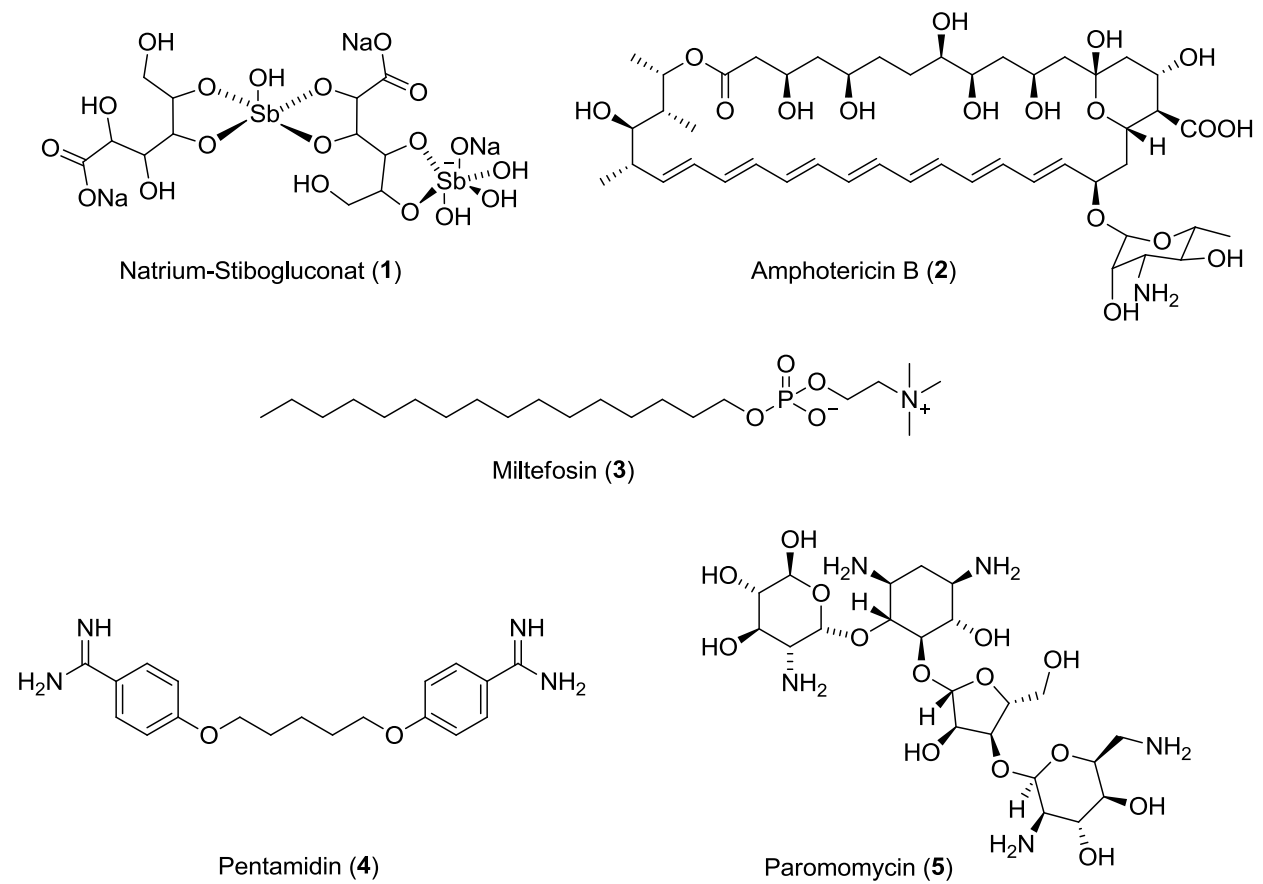


Abbildung 3: Zur Therapie von Leishmaniose eingesetzte Medikamente ^{7, 17}.

1.2 Trypanosomiasis

Die Amerikanische und die Afrikanische Trypanosomiasis werden durch protozoische Parasiten der Gattung *Trypanosoma* (*T.*) hervorgerufen. Die resultierenden Krankheitsbilder Chagas und die afrikanische Schlafkrankheit werden durch unterschiedliche Spezies der Trypanosomen ausgelöst ^{4, 20}. Auch Trypanosomen sind Flagellaten und durchlaufen in ihren Lebenszyklen einen Formenwandel, wobei auch hier die morphologischen Unterschiede wie bei Leishmanien in der Position der Geißel relativ zum Zellkern und in der Länge der Zelle selbst liegen ^{14-15, 21}.

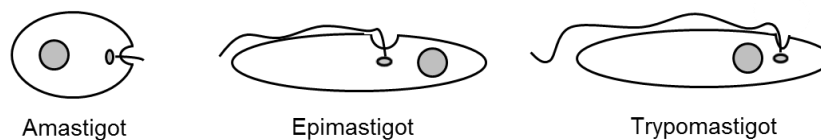


Abbildung 4: Morphologien der Trypanosomen ¹⁴⁻¹⁵.

Die Formen, in denen Trypanosomen vorliegen können, sind in Abbildung 4 schematisiert. Bei der amastigoten Form, in welcher auch die Leishmanien auftreten, ist eine rudimentäre Geißel vorhanden, welche nicht aus der Zelloberfläche heraustritt. Epimastigoten und Trypomastigoten weisen im Vergleich zu Amastigoten einen länglichen, gestreckteren Grundkörper auf. Bei der epimastigoten Form tritt die Geißel in der Zellmitte vor dem Kern aus, bei Trypomastigoten am Zellende hinter dem Kern ^{14-15, 22}.

1.2.1 Chagas

Auslöser der Amerikanischen Trypanosomiasis, auch Chagas genannt, sind die protozoischen Parasiten *T. cruzi*²³. Laut DNDi leben in Süd- und Mittelamerika schätzungsweise 100 Millionen Menschen mit dem Risiko an Chagas zu erkranken. Jährlich werden 8 Millionen Fälle verzeichnet, von denen 12 000 tödlich verlaufen²⁴. Überträger der *T. cruzi* ist eine Raubwanze der Subfamilie *Triatominae*, die bei einer Blutmahlzeit Kot absetzt, in welchem sich die infektiösen Erreger befinden. Dieser wird häufig wegen des durch den Stich entstandenen Juckreizes in die verletzte Stelle eingerieben, wodurch die Erreger in den Organismus des Wirtes gelangen^{19, 25}.

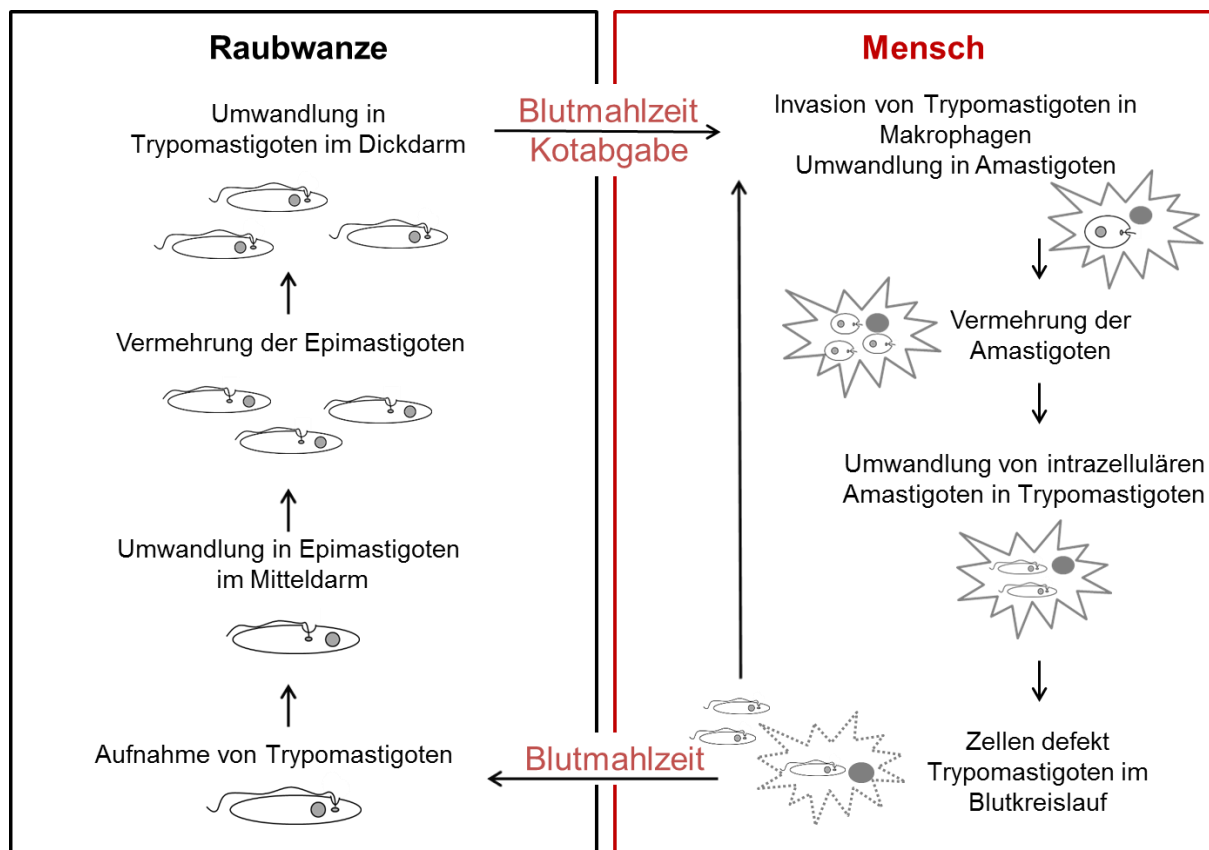


Abbildung 5: Übertragung und Lebenszyklus von *T. cruzi*^{15, 22}.

Die Trypomastigoten werden im Wirt in Zellen aufgenommen und in die amastigote Form umgewandelt. Als solche vermehren sie sich intrazellulär. Nach erneuter Umwandlung zu Trypomastigoten wird die Wirtszelle zerstört, wodurch die

Trypomastigoten in die Blutbahn gelangen. Dort können sie weitere Zellen des Wirtes befallen, aber auch neue blutsaugende Raubwanzen infizieren. Diese nehmen mit der Blutmahlzeit Trypomastigoten auf. Im Darm der Wanze wandeln sich die Parasiten in Epimastigoten um, welche sich im Verdauungstrakt durch Teilung vermehren. Im Enddarm entstehen aus den Epimastigoten erneut die Trypomastigoten, welche mit dem Kot auf den Wirt übertragen werden können (siehe Abbildung 5) ^{15, 22, 26}.

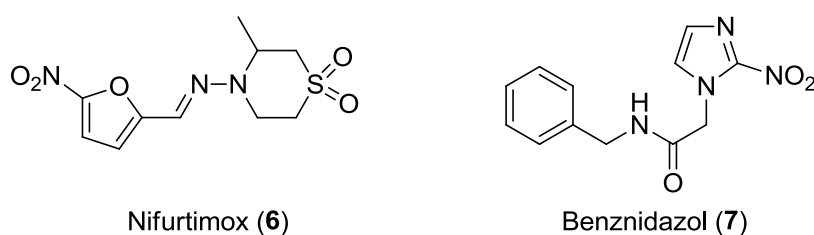


Abbildung 6: Zur Therapie von Chagas eingesetzte Arzneistoffe ^{22, 27}.

Die zwei zur Behandlung von Chagas eingesetzten Wirkstoffe sind Nifurtimox (6) und Benznidazol (7) (siehe Abbildung 6) ^{15, 26, 28}. Beide Medikamente sind nur zu 100% effektiv, wenn sie in der ersten, akuten Phase dieser Infektionskrankheit verabreicht werden (Tag 7-30 nach der Infektion). Diese Phase verläuft meist symptomlos. Lediglich bei 1-2% der Infizierten treten u. a. Fieber, Ödeme und Lymphknotenschwellungen auf. Anschließend an die erste Phase folgt nach 8-10 Wochen die latente Phase, in welcher Krankheitszeichen fehlen, aber Antikörper nachweisbar sind. Die dritte Phase ist die Chronische. Bei dieser treten 10-20 Jahre nach der akuten Phase Folgen der Schädigungen des autonomen Nervensystems und der Gewebszellen auf ¹⁵. Die verfügbaren Arzneistoffe 6 und 7 gelten als mutagen, weswegen die Behandlung von Schwangeren problematisch ist. Bei Patienten mit Nieren- oder Leberschäden sollten die Wirkstoffe 6 und 7 auf Grund erheblicher weiterer Nebenwirkungen ebenfalls nicht verabreicht werden. Bei Infizierten mit neurologischen oder psychischen Vorerkrankungen ist von der Verabreichung von Nifurtimox abzusehen ^{22, 27, 29}.

1.2.2 Humane afrikanische Trypanosomiasis

Die humane afrikanische Trypanosomiasis (HAT), auch afrikanische Schlafkrankheit genannt, wird durch den Erreger *T. brucei* verursacht, der durch einen Stich der Tsetse-Fliege auf den Wirt übertragen wird ⁴.

Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 7 die Übertragung und der Lebenszyklus von *T. brucei* dargestellt. Im Gegensatz zu *T. cruzi* liegen *T. brucei* ausschließlich extrazellulär im Blut oder in anderen Körperflüssigkeiten vor ^{19, 30}. Mit dem Speichel der infizierten Tsetse-Fliege werden Trypomastigoten in das Gewebe des Wirtes inokuliert. Von dort gelangen die Trypomastigoten in das lymphatische System und in die Blutbahn, wo sie sich vermehren. Ausgehend vom Blutstrom kann das zentrale Nervensystem infiltriert werden, wodurch typische Symptome der afrikanischen Schlafkrankheit auftreten, darunter neurologische Störungen und ein erhöhtes Schlafbedürfnis ^{15, 31}.

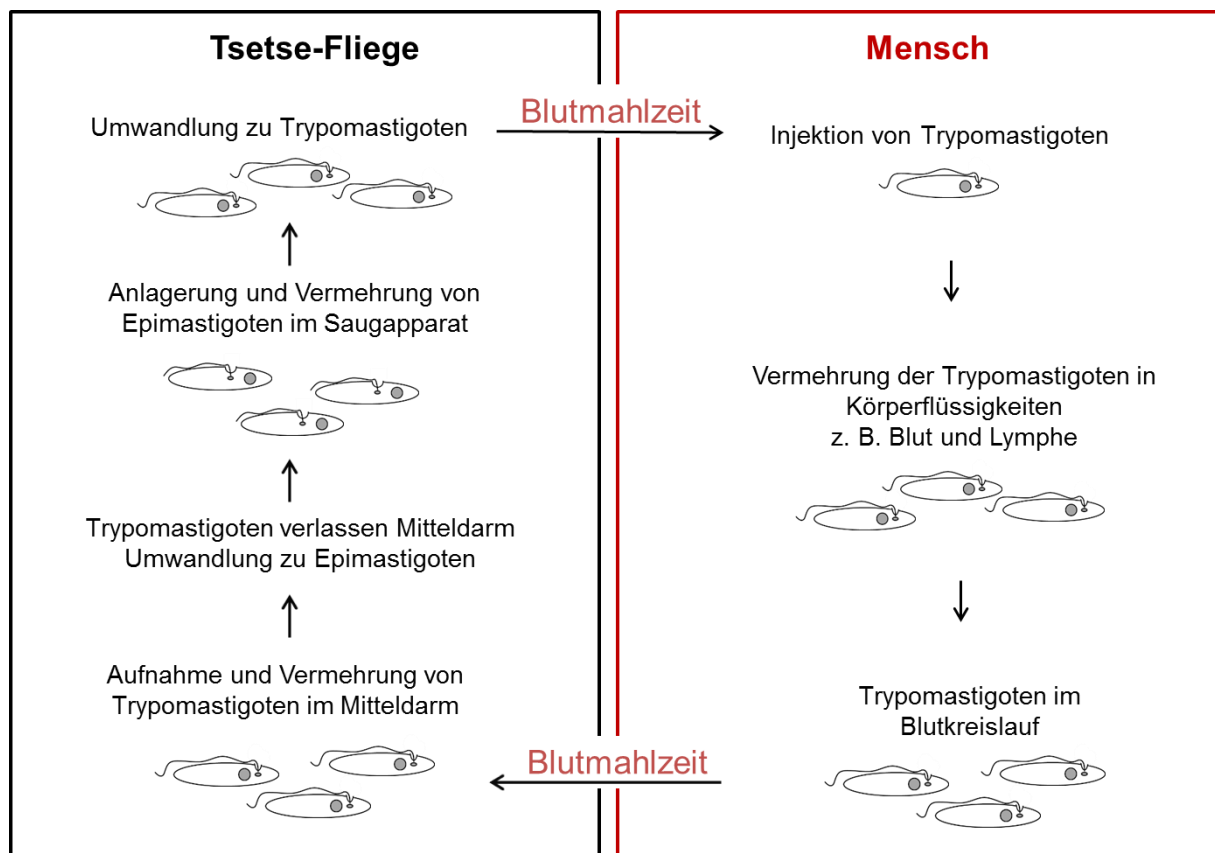


Abbildung 7: Übertragung und Lebenszyklus von *T. brucei* ^{15, 31}.

Nimmt die Tsetse-Fliege eine Blutmahlzeit von einem infizierten Wirt auf, gelangen die sich im Blutkreislauf befindlichen Parasiten in den Verdauungstrakt des Insekts. Die Trypomastigoten vermehren sich im Mitteldarm der Fliege und werden anschließend in Epimastigoten umgewandelt. Diese lagern sich im Saugapparat an, wo sie sich erneut vermehren und von wo aus sie bei der nächsten Blutmahlzeit nach der Umwandlung zu Trypomastigoten weiter übertragen werden können ^{15, 31}.

Humanpathogene *Trypanosoma brucei* (*T. b.*) treten in zwei Unterarten auf. Dabei handelt es sich um *T. b. rhodesiense*, welche in den Savannengebieten von Uganda bis Mosambik ein akutes Krankheitsbild hervorrufen, und *T. b. gambiense*, die in Westafrika einen chronischen Krankheitsverlauf auslösen ^{4, 32-33}. Die WHO geht von schätzungsweise 500 000 infizierten Menschen in afrikanischen Gebieten südlich der Sahara aus. Jährlich kommen mehr als 30 000 Fälle hinzu ³. Unbehandelt führt die Afrikanische Schlafkrankheit zum Tod. Für die Therapie ist von Relevanz, wie weit der Krankheitsverlauf fortgeschritten ist, sodass im Anschluss an eine Stadieneinteilung die richtigen therapeutischen Optionen gewählt werden können. Hier wird zwischen dem Stadium I, dem hämolympathischen Befall, und dem Stadium II, dem enzephalitischen Stadium mit Überwindung der Bluthirnschranke durch die Parasiten, unterschieden ^{4, 15, 19, 32}.

Die Therapiemöglichkeiten der Afrikanischen Schlafkrankheit sind auf einige wenige Arzneistoffe begrenzt. Aktuell eingesetzt werden Suramin (**8**), Pentamidin (**4**), Melarsoprol (**9**), Eflornithin (**10**) und Nifurtimox (**6**) (siehe Abbildung 8) ^{3, 6, 34}. Neben toxischen Effekten und Applikationsproblemen treten immer häufiger Resistenzen auf. Suramin (**8**) und Pentamidin (**4**) werden als Chemotherapie in der frühen Phase dieser Krankheit eingesetzt, wobei Erstgenanntes nur verabreicht wird, sofern es sich bei dem Erreger um *T. b. rhodesiense* handelt. Die Infektion durch *T. b. gambiense* wird in Stadium I ausschließlich mit Pentamidin (**4**) behandelt ³⁵. Die Therapieoptionen im zweiten Stadium der Afrikanischen Schlafkrankheit, in welchem die Parasiten die Bluthirnschranke überwinden, sind auf die intravenös zu applizierenden Arzneistoffe Melarsoprol (**9**) und Eflornithin (**10**) beschränkt, wobei Letzteres ausschließlich bei Infektionen mit *T. b. gambiense* wünschenswerte Effekte zeigt. Die therapiebedingte Letalität bei dem derzeit am häufigsten verwendeten, arsenhaltigen Melarsoprol (**9**) liegt bei 6-12% ³. Das aus der Therapie von Chagas bekannte Nifurtimox (**6**) wird in einer Kombinationstherapie mit Eflornithin (**10**) solchen

Patienten verabreicht, die sich bereits im zweiten Stadium der durch *T. b. gambiense* ausgelösten Infektionskrankheit befinden³⁶⁻³⁸.

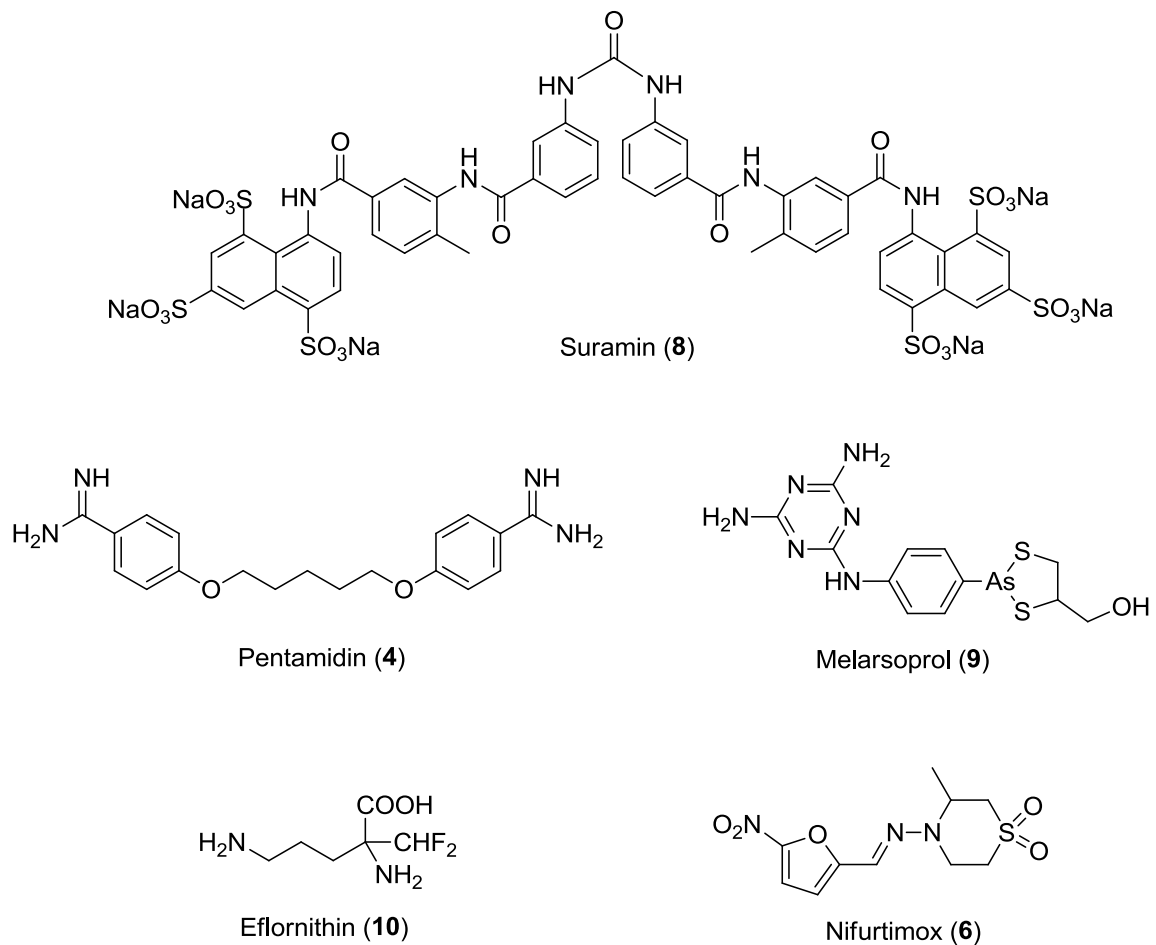


Abbildung 8: Zur Therapie von Trypanosomiasis eingesetzte Medikamente^{3, 34}.

„Alternative Medikamente wurden zwar entdeckt und zugelassen, aus Rentabilitätsgründen in den letzten Jahren jedoch wieder vom Markt genommen. [...] Abgesehen von den Aktivitäten einiger humanitärer Organisationen besteht kaum ein Interesse mehr am Wohl der Menschen und der Entwicklung ihrer Länder“⁴. Dieses Zitat von STICH⁴ beschreibt die Gesundheitspolitik der Pharmaindustrien gegenüber wenig gewinnbringenden Projekten zur Herstellung von Medikamenten gegen Dritte-Welt-Krankheiten. Nur wenige neue potentielle Medikamente befinden sich in klinischen Testungen, darunter das für die orale Applikation vorgesehene Fexinidazol (1-Methyl-2-[[p(methylthio)phenoxy]methyl]-5-nitroimidazol) und SCYX-7158, ein oral aktives Benzoxaborol³⁸⁻⁴⁰.

Auch der afrikanische Viehbestand ist von durch Trypanosomen ausgelösten Krankheiten betroffen. Die Subspezies *T. b. brucei* ist Auslöser der Nagana-Krankheit, welche das Wachstum des Viehbestands in Afrika stark einschränkt. Rund 3 Millionen Nutztiere erliegen jährlich der von der Tsetse-Fliege übertragenen Seuche. Der dadurch entstehende wirtschaftliche Schaden ist mit ca. 6-12 Millionen US-Dollar jährlich enorm. Insbesondere arme Bauern bangen durch das Sterben der Rinder, Schafe und Ziegen um ihre Nahrungsquellen und somit um ihr eigenes Überleben. Eingesetzte Wirkstoffe gegen diese Erkrankungen sind limitiert. Bedingt durch die jahrzehntelange Applikation einiger weniger Therapeutika treten zunehmend Resistenzen auf ⁴¹⁻⁴⁴. Neuartige antitrypanosomale Wirkstoffe werden daher dringend benötigt.

1.3 Das Trypanothionsystem

Bei einer Infektion eines Menschen mit Trypanosomen bzw. Leishmanien reagiert das Immunsystem des humanen Organismus mit oxidativen Angriffen auf den Parasiten ⁴⁵. Zur Aufrechterhaltung der Redoxbalance besitzen diese, wie auch der Mensch, ein Thiolssystem. Die protozoischen Parasiten der Ordnung *Kinetoplastida* verfügen über ein einzigartiges Redoxsystem, bei welchem das ubiquitäre Glutathion/Glutathionreduktase-System durch ein Trypanothion/Trypanothionreduktase-System mit dem zentralen Cofaktor Trypanothion (T(SH)_2) ersetzt ist. Dieses ist in eine Vielzahl zellulärer Prozesse verwickelt ^{10, 20, 28, 46}.

Die gezielte Inhibitorsynthese für ein Target, welches sowohl essentiell für den Parasiten als auch abwesend im Wirt ist, verspricht potentiell selektive, mit wenigen Nebenwirkungen verbundene Wirkstoffe zu liefern. Im Falle der *Trypanosomatidae* stellen Enzyme des parasitenspezifischen Trypanothionmetabolismus mögliche Targets für antitrypanosomale Wirkstoffe dar ^{10, 29}. Mit Hilfe der Abbildung 9 und der Abbildung 10 wird die Biosynthese von Trypanothion (N^1, N^8 -Bis-(glutathionyl)-spermidin, **19**) im Detail beschrieben. Das Polyamin Spermidin (**13**) und das Tripeptid Glutathion (**15**) sind Edukte für die Synthese von Trypanothion (T(SH)_2 , **19**).

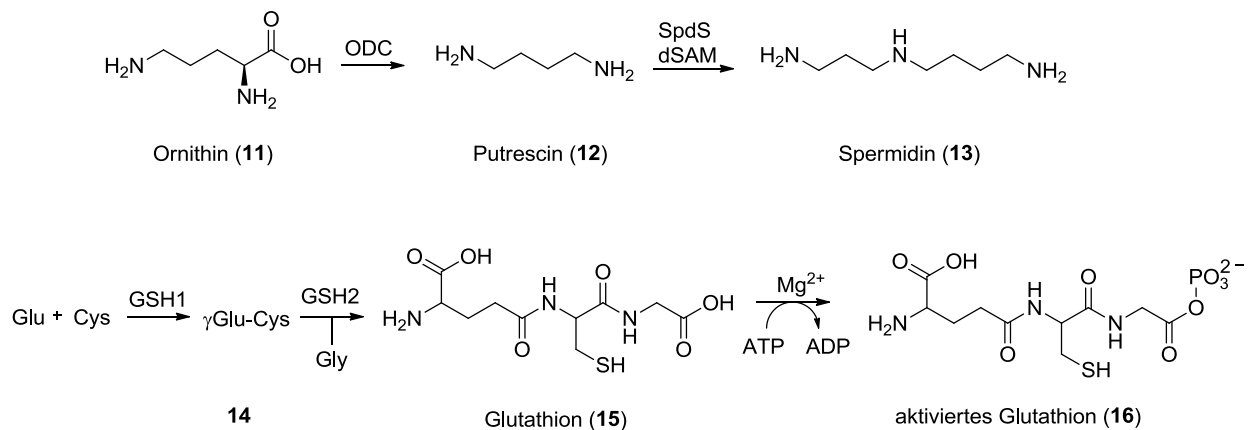


Abbildung 9: Biosynthese von Spermidin (13) und Glutathion (15) ⁴⁷.

ODC: Ornithindecaboxylase; SpdS: Spermidinsynthetase; dSAM: decarboxyliertes S-Adenosylmethionin; GSH1: γ-Glutamylcysteinsynthetase; GSH2: Glutathionsynthetase.

Die unterschiedlichen Spezies der Trypanosomatiden weisen keinen einheitlichen Mechanismus für die Spermidinproduktion auf ⁴⁸. *T. cruzi* Epimastigoten sind nicht in der Lage ausreichend Putrescin für den Syntheseweg nach Abbildung 9 zu bilden. Daher bedienen sie sich an Polyaminen aus dem Medium, mit deren Hilfe sie genügend Spermidin für die Trypanothionsynthese produzieren können ⁴⁹. Im Gegensatz dazu gelangen Leishmanien und *T. brucei* über den in Abbildung 9 dargestellten Syntheseweg an das benötigte Spermidin ⁵⁰. Ausgehend von Ornithin (11) wird zunächst über eine durch die Ornithindecaboxylase (ODC) katalysierte Decarboxylierung Putrescin (12) gebildet. Durch dessen anschließende Umsetzung mit decarboxyliertem S-Adenosylmethionin (dSAM) in Anwesenheit von Spermidinsynthetase (SpdS) entsteht Spermidin (13) ^{20, 51-52}.

Die erste Stufe der biologischen Synthese des Glutathions (GSH, 15) ist die durch die γ-Glutamylcysteinsynthetase (GSH1) katalysierte ATP-abhängige Ligation von Glutaminsäure (Glu) und Cystein (Cys) zu γ-Glutamylcystein (14). Die anschließende ATP-abhängige Ligation von 14 und Glycin mit Hilfe der Glutathionsynthetase (GSH2) liefert GSH (15). Mittels Mg²⁺/ATP muss die Carboxylfunktion des Glutathions phosphoryliert werden (16), um eine über C-N-Ligasen vermittelte Verknüpfung mit Spermidin eingehen zu können (siehe Abbildung 9) ^{20, 47}.

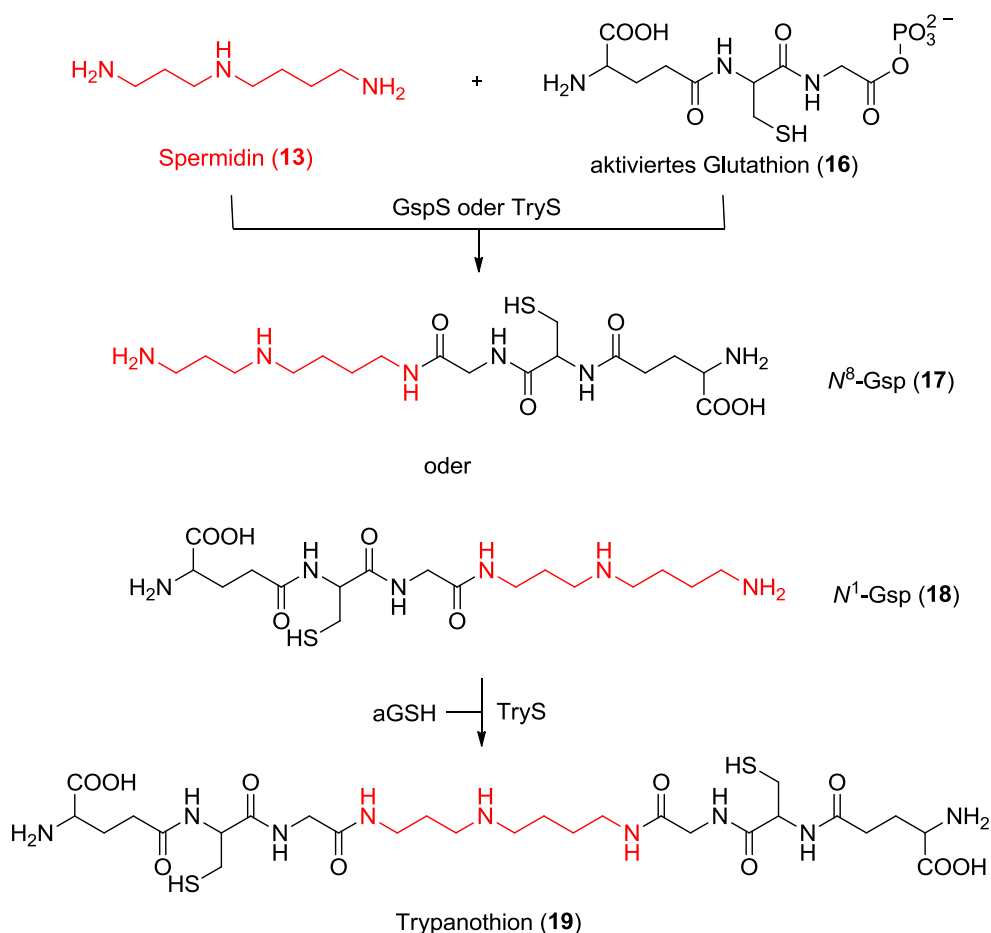


Abbildung 10: Trypanothionbiosynthese^{47, 53}.

aGSH: durch Phosphorylierung aktiviertes Glutathion (16); GspS: Glutathionylspermidinsynthetase; Gsp: Glutathionylspermidin; TryS: Trypanothionsynthetase.

Erste Untersuchungen an dem Einzeller *Crithidia fasciculata* (C. f.) zur Biosynthese von T(SH)₂ (19) aus GSH und Spermidin gingen von einem Enzym aus, welches sowohl die Bildung von Glutathionylspermidin 17 bzw. 18 im ersten Schritt, als auch die von Trypanothion (19) im zweiten Reaktionsschritt katalysieren sollte⁵⁴. Spätere Untersuchungen an C. f. zeigten, dass zwei Enzyme an der Trypanothionbiosynthese beteiligt sind. Zum einen handelt es sich um die Glutathionylspermidinsynthetase (GspS), welche die Verknüpfung von Spermidin (13) mit einem aktivierten Glutathionmolekül (16) zu den Zwischenprodukten N^8 - oder N^1 -Glutathionylspermidin (17, 18) katalysiert, zum anderen um die Trypanothionsynthetase (TryS), welche die Addition eines zweiten aktivierten Glutathionmoleküls an die Zwischenstufe 17 bzw. 18 zum T(SH)₂ (19) beschleunigt (siehe Abbildung 10)^{20, 45, 50, 55}. Heutzutage ist bekannt, dass die TryS ebenfalls in der Lage ist, den ersten Schritt der Biosynthese

zu den Zwischenprodukten **17** bzw. **18** zu katalysieren. Gezeigt werden konnte, dass in den Parasiten *T. brucei*, *L. braziliensis* und *L. major* lediglich die TryS in die Trypanothionbiosynthese involviert ist, während in *C. fasciculata*, *T. cruzi* und *L. infantum* neben der TryS auch die GspS zu finden ist^{29, 50, 53, 56}. Die GspS ist aber in allen Trypanosomatiden durch die TryS ersetzbar. Der Grund der Koexistenz zweier Katalysatoren für einen Syntheseschritt ist bis heute ungeklärt⁴⁷. Sowohl die TryS als auch die GspS sind bifunktional. Sie katalysieren nicht nur die Synthese, sondern auch die Hydrolyse von T(SH)₂ und Glutathionylspermidin (Gsp) zu Spermidin und Glutathion. Es handelt sich somit bei diesen Enzymen um Synthetasen-Amidasen, wobei die Amidaseaktivität gegenüber der Synthetaseaktivität vernachlässigbar gering ist^{47, 57-58}. Möglicherweise dient die zusätzlich zur TryS vorhandene GspS als Regulator des Polyaminlevels in den Parasiten. Polyamine sind u. a. im Zellwachstum involviert⁵⁹.

Der zentrale Faktor im parasitären Redoxmetabolismus, das Trypanothion (**19**), fungiert im Rahmen der Aufrechterhaltung der Redoxbalance als Elektronendonator²⁰. T(SH)₂ kann direkt und indirekt reduzierend sein, wobei bei Letzterem das Tryparedoxin (TXN) als Reaktionspartner fungiert. TXN wird von T(SH)₂ reduziert und kann unter Reduktion von Tryparedoxinperoxidase (TXNPx) beispielsweise Peroxide zu Alkohol und Wasser abbauen (siehe Abbildung 11)^{29, 53, 56, 60}.

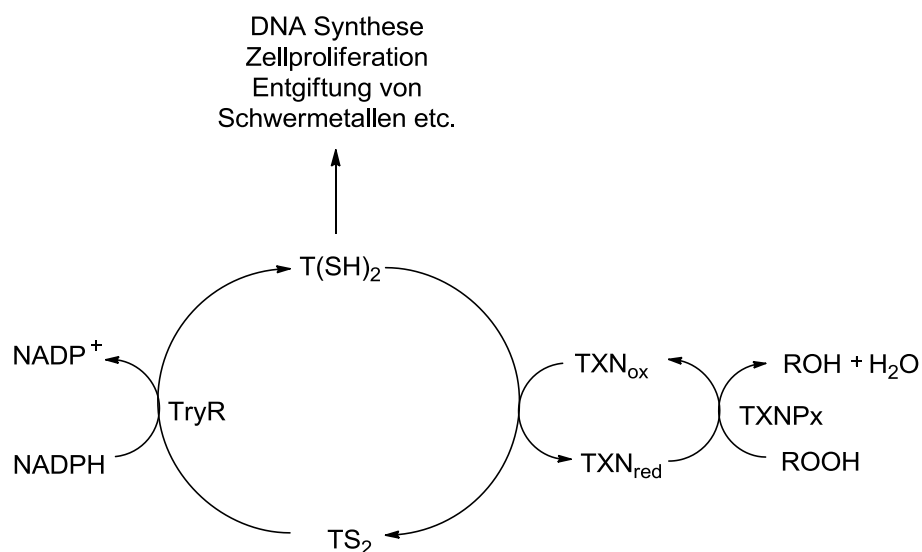


Abbildung 11: Das Trypanothion-Redoxsystem im Parasiten^{29, 53}.

TXN: Tryparedoxin; TXNPx: Tryparedoxinperoxidase.

T(SH)₂ wird im Rahmen verschiedener zellulärer Prozesse zu seiner zyklischen Disulfidform (TS₂) oxidiert, welche mit Hilfe der NADPH-abhängigen Trypanothionreduktase (TryR) zu T(SH)₂ regeneriert werden kann⁶¹⁻⁶². T(SH)₂ spielt beispielsweise bei der DNA-Synthese, der Zellproliferation und der Entgiftung von Schwermetallen eine Rolle (siehe Abbildung 11)^{29, 53}.

Die Targetvalidierung stellt einen Schlüsselschritt zum gezielten Wirkstoffdesign dar⁹. Da das Trypanothionsystem für die Trypanosomatiden essentiell und im menschlichen Wirt nicht vorhanden ist, stellen die Trypanothionreduktase und -synthetase potentielle Targets für die Synthese neuer Wirkstoffe dar^{10, 20, 33, 63}. Eine Inhibition des Trypanothions würde das gesamte Trypanothionsystem aus dem Gleichgewicht bringen und das Überleben des Parasiten im menschlichen Organismus verhindern. In *knockout*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl die TryR als auch die TryS essentiell für den Parasiten sind⁴⁵. In einer Publikation von FLOHÉ⁵³ wird von *knockout*-Experimenten in *T. brucei* berichtet, bei denen im ersten Experiment die TryR-Aktivität und in einem zweiten Versuch die TryS-Aktivität auf 5% verglichen mit der des Wildtyps reduziert wurde. Während die TryR-Restaktivität von lediglich 5% ausreichte, die Redoxbalance im Parasiten aufrecht zu erhalten, waren die *T. brucei* mit einer TryS-Restaktivität von 5% nicht überlebensfähig⁴⁷. Auf der Suche nach neuen Arzneistoffen zur Behandlung der von Trypanosomen und Leishmanien hervorgerufenen Infektionskrankheiten stellt daher die Trypanothionsynthetase im Rahmen dieser Arbeit das angestrebte Target dar.

1.4 Wirkstoffentwicklung

Seit der gezielten Synthese organischer Verbindungen mit therapeutischen Eigenschaften vor über einem Jahrhundert bis zum heutigen Design neuer Wirkstoffe hat sich an einer Tatsache nichts geändert: „Wirkstoffdesign ist nicht exakt planbar“⁶⁴. Das Wissen über Zusammenhänge der chemischen Struktur und der biologischen Wirkung im Organismus ist nicht ausgereift genug, um mögliche Konsequenzen kleinster struktureller Veränderungen vorhersagen zu können. Bis heute wird im Bereich der Wirkstoffentwicklung die Methode des Versuchs und Irrtums angewandt. Über viele Jahrzehnte empirisch abgeleitete Regeln führten zu einem theoretischen Leitbild für Wirkstoffe. So ist beispielsweise die von Lipinsky et al.⁶⁵ aufgestellte „rule of 5“ weltbekannt. Sie stellt eine Faustregel für die orale Bioverfügbarkeit potentieller Wirkstoffe dar. Demnach ist eine chemische Substanz oral bioverfügbar, wenn sie weniger als 5 Wasserstoffbrückenbindungsdonoren, weniger als 10 Wasserstoffbrückenbindungsakzeptoren, eine Molekularmasse kleiner 500 g/mol und einen Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten kleiner 5 aufweist. Dennoch hat sich seit Beginn der Arzneistoffsynthese vieles verändert. Neben einem sehr viel größeren Verständnis für molekulare Mechanismen der Wirkung von Arzneistoffen und der stetigen Aufklärung weiterer Genome stehen den Wissenschaftlern für die Wirkstoffsuche heute zahlreiche neue Technologien zur Verfügung. Darunter fallen u. a. die Proteinkristallographie und die Kernresonanzspektroskopie, welche die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen und ihrer Ligandkomplexe ermöglicht, wodurch der gezielte Entwurf von Wirkstoffen unterstützt wird. Mit Hilfe von ausreichenden Sequenzhomologien unterschiedlicher Genome können „Modellierungsprogramme eine beachtliche Zuverlässigkeit“⁶⁴ bei strukturellen Vorhersagen erreichen. Das struktur- und computergestützte Design neuer Wirkstoffe ist aus der heutigen Pharmabranche inzwischen nicht mehr wegzudenken⁶⁶⁻⁶⁷.

Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde die Suche nach neuen trypanoziden Wirkstoffen von computergestützten Untersuchungen begleitet.

1.5 Trypanothionsynthetase

Die Beschreibung der TryS auf molekularer Ebene basiert auf publizierten Röntgenkristallstrukturen der TryS von *Leishmania major* (LmTryS) und der GspS von *Escherichia coli* (EcGspS)^{57, 68}. Mit Hilfe der zwei Kristallstrukturen und molekularen Dynamiksimulationen konnte ein Eindruck von den Bindemodii der Substrate in der TryS und dem Ablauf der Biosynthese von T(SH)₂ erhalten werden⁴⁷.

Sowohl die GspS als auch die TryS sind aus zwei Domänen aufgebaut, die N-terminale Amidase-Domäne und die C-terminale Synthetase-Domäne (siehe Abbildung 12), welche sowohl die Biosynthese als auch die Hydrolyse von T(SH)₂ bzw. Gsp katalysieren^{58, 69-70}.

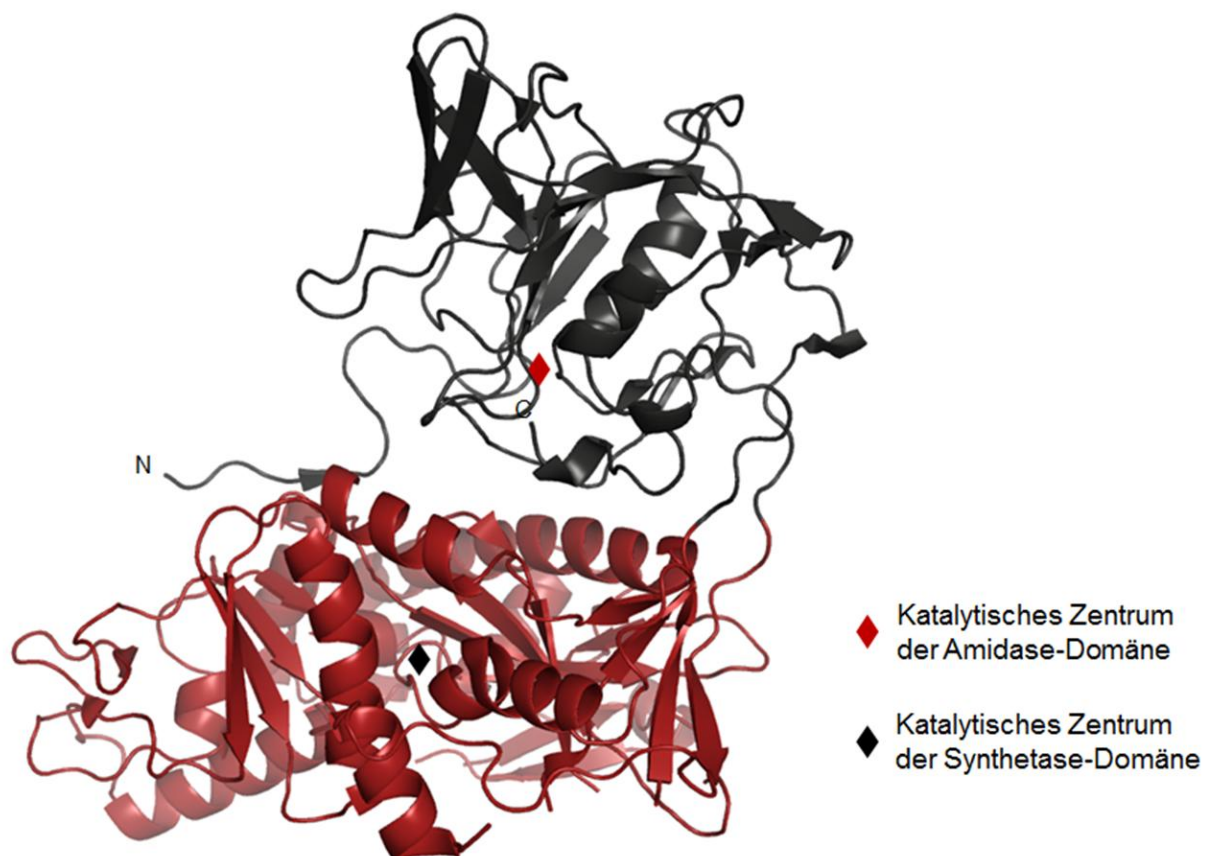


Abbildung 12: LmTryS-Röntgenkristallstruktur (pdb-Code: 2VOB); Darstellung der Amidase-Domäne (schwarz) und der Synthetase-Domäne (rot) und deren katalytischer Zentren nach FYFE et al.⁵⁷.

Bisherige Versuche zur Cokristallisation der *LmTryS* mit einem Substrat schlugen fehl, sodass zur Beschreibung des Substratbindemodus in der TryS auf die Annahme ähnlicher Bindungsmodii in GspS und TryS zurückgegriffen wurde. Aus der *EcGspS*-Struktur mit Substrat konnte der Bindemodus für GSH, Mg^{2+} /ATP und Spermidin abgeleitet und auf Grund der ausgesprochen ähnlichen Strukturen von GspS und TryS in die leere Bindetasche der Struktur von *LmTryS* übertragen werden. Gefunden wurde eine trianguläre Anordnung von GSH, ATP und Spermidin, welche zunächst die Aktivierung von GSH und anschließend die Umsetzung mit Spermidin möglich macht (siehe Abbildung 13)⁵⁷. In beiden Enzymen konnten gut strukturierte Bindungsstellen für Mg^{2+} /ATP (S1) und GSH (S2) gefunden werden, wohingegen die Bindungsregion für Spermidin (S3) wenig charakteristisch aufgebaut ist^{47, 71}. Der erste Schritt der Trypanothionbiosynthese zum Gsp konnte so mit Hilfe der zwei Kristallstrukturen nachvollzogen werden.

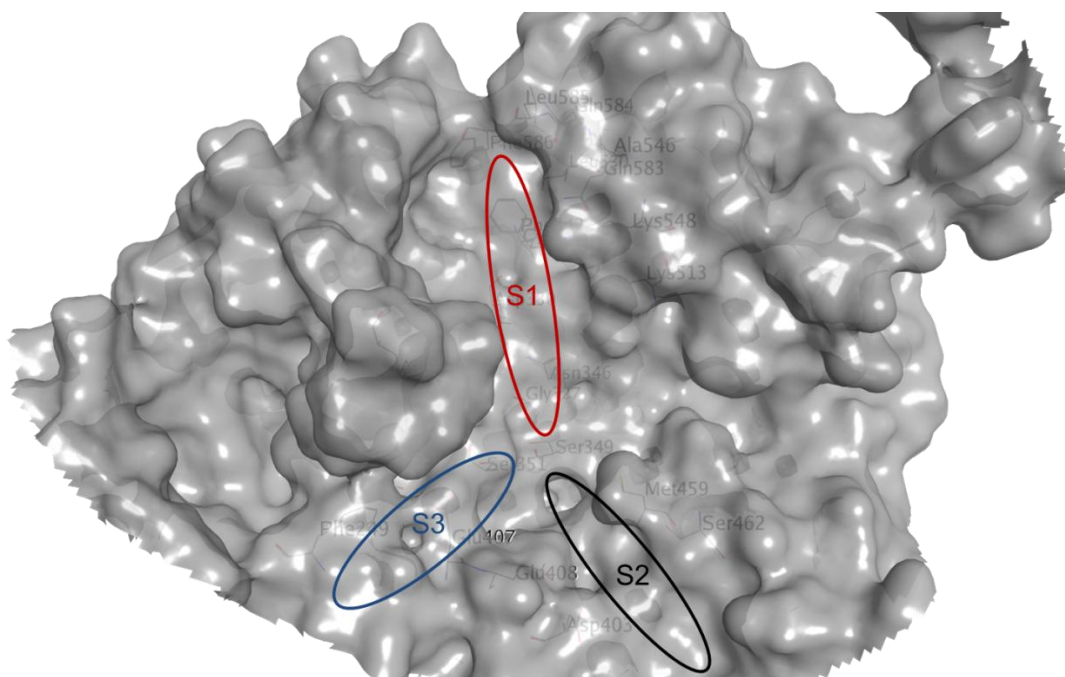


Abbildung 13: Katalytisches Zentrum der Synthetase-Domäne der *LmTryS*;
Darstellung der Substratbindetaschen: S1 = ATP-Bindetasche (rot), S2 = Glutathion-
Bindetasche (schwarz), S3 = Spermidin-Bindetasche (blau).

Für den mechanistischen Ablauf der Synthese von $T(SH)_2$ ausgehend von dem Zwischenprodukt Gsp wurden von Comini et al.⁷² drei Möglichkeiten postuliert. Die Ligation zweier Moleküle GSH an die entgegengesetzten Enden eines Spermidins könnte in der TryS (1) entweder in zwei unterschiedlichen reaktiven Zentren des Enzyms ablaufen, oder (2) in einem reaktiven Zentrum, welches flexibel genug ist, beide Seiten des Spermidins zu substituieren. Die dritte Möglichkeit (3) wäre, dass das beim ersten Reaktionsschritt entstandene Gsp seine Position ändern muss, um die noch freie Aminogruppe am reaktiven Zentrum zu positionieren. Anhand der Kristallstruktur der TryS konnten die ersten beiden Möglichkeiten (1) und (2) ausgeschlossen werden. Das identifizierte reaktive Zentrum des ersten Reaktionsschrittes ist nicht flexibel genug, um beide Enden des Spermidins substituieren zu können und es existieren keine Anhaltspunkte für ein zweites reaktives Zentrum⁴⁷. Daher blieb die postulierte Positionsänderung des Gsp als einzig realistische Variante übrig⁵⁷. Unter Zuhilfenahme von *molecular modeling* und *molecular dynamic simulations* wurde eine zweite GSH-Bindungsstelle aufgedeckt, welche zusammen mit der aus der EcGspS bekannten Spermidintasche (S3) eine ideale Bindungsregion für Gsp darstellt. N^8 -Gsp ist dabei auf Grund eines stabileren Bindungsmodus in der Bindetasche das gegenüber N^1 -Gsp präferierte Substrat⁷¹.

Die Untersuchungen der Reaktionsabläufe innerhalb der TryS mit einer Kombination von Röntgenkristallstrukturanalysen und molekularen Dynamiksimulationen weisen zusammengefasst auf den im Folgenden beschriebenen Verlauf der Trypanothionbiosynthese hin: Im ersten Reaktionsschritt binden die Substrate Mg^{2+}/ATP , GSH und Spermidin in einer triangularen Anordnung in den Taschen S1, S2 und S3 (siehe Abbildung 13), wo nach erfolgter Phosphorylierung von GSH die Ligation an das Spermidin zum Zwischenprodukt Gsp stattfindet. Das synthetisierte Gsp muss die S2/S3-Bindungsstelle ebenso wie das ADP die S1-Tasche verlassen, wodurch neues ATP und GSH aufgenommen werden können. Das Gsp bindet im zweiten Reaktionsschritt in die S3-Bindetasche und die zweite gefundene GSH-Bindetasche, sodass der noch nicht glutathionylierte Spermidinrest zum reaktiven Zentrum zeigt. Durch die Ligation des zweiten GSH wird schließlich $T(SH)_2$ synthetisiert^{47, 71}.

Erste Versuche der TryS-Inhibitorsynthese wurden ohne die heutigen strukturellen Vorkenntnisse der Bindetasche durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass GSH selbst die TryS inhibiert, wodurch die Idee entstand, GSH als Leitstruktur für die Synthese von Inhibitoren einzusetzen. Auch der tetraedrische Übergangszustand bei der Gsp-Synthese diente bei der Suche nach Wirkstoffen als Vorlage⁷³⁻⁷⁴. Desweiteren wurde vermutet, dass ATP-Analoga potentielle Inhibitoren darstellen. In einem *screening* von Proteinkinaseinhibitoren, welche die ATP-Bindetasche der Kinasen adressieren, konnten 7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one, auch als Paullone bezeichnet, als CfTryS Inhibitoren identifiziert werden^{47, 60, 75}.

2 Motivation und Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit war die Synthese neuartiger, antitrypanosomaler N^5 -substituierter Paullone. Die Substanzklasse der Paullone, 7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one (**20**), ist u. a. bekannt als Proteinkinaseinhibitoren. Neben der inhibitorischen Aktivität gegenüber CDK1, CDK2 und GSK-3 zeigen Paullone eine antiproliferative Wirkung gegenüber Tumorzellen ⁷⁶.

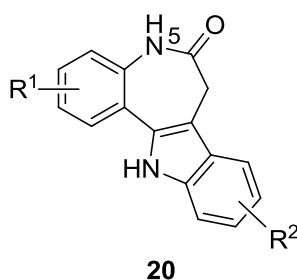
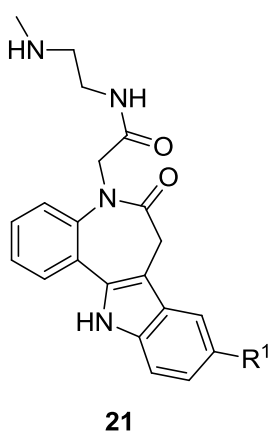


Abbildung 14: Struktur der Paullone bzw. 7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one.

Im Arbeitskreis KUNICK synthetisierte Paullonderivate wiesen zudem antileishmanielle Aktivitäten auf ¹⁷. Diese Ergebnisse wurden in einer Publikation von FLOHÉ ⁶⁰ bekräftigt, worin Paullone, insbesondere am Lactamstickstoff substituierte Derivate, als niedrig nanomolar wirksame *Cf*TryS-Inhibitoren beschrieben werden. Bei den Testungen dieser Verbindungen an den TryS-Proteinen humanpathogener Spezies wiesen die Paullone jedoch weitaus geringere inhibitorische Aktivitäten auf. Im Rahmen dieser Arbeit sollte durch die Synthese weiterer N^5 -substituierter Paullone eine Optimierung der Inhibitoren auf die TryS-Enzyme der Trypanosomen bzw. Leishmanien erfolgen.

Zur Entwicklung neuer antitrypanosomaler Wirkstoffe wurden zunächst die Ergebnisse bereits publizierter Strukturen betrachtet, um daraus eine Leitstruktur für weitere Derivate zu entwickeln. STUHLMANN et al.⁷⁷ stellten eine Reihe von Paullon-*N*⁶-acetamiden her und testeten diese auf deren inhibitorische Eigenschaften gegenüber der Trypanothionsynthetase (TryS), wobei nicht dargelegt wurde, von welcher Spezies die TryS stammte (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Von STUHLMANN et al.⁷⁷ synthetisierte Paullon-*N*⁶-acetamidderivate (**21a-d**) und deren Inhibition gegenüber der TryS in Prozent bei c = 10 µM.



21	R¹	Inhibition der TryS in %
a	-Br	92.4
b	-CN	51.7
c	-CH ₃	20.5
d	-H	0

Bei Betrachtung der Tabelle 1 unter dem Aspekt der Struktur-Wirkungs-Beziehung fällt auf, dass der Bromsubstituent in Position 9 der Verbindung **21a** gegenüber der Cyan- oder Methylgruppe der Verbindungen **21b** und **21c** zu einer Steigerung der Inhibition der TryS führt. Das an der Position 9 unsubstituierte Paullon **21d** zeigt keine inhibitorische Aktivität. Die in dieser Arbeit eingesetzte Ausgangsverbindung **20a** für die Synthese von *N*⁵-substituierten Paullonen weist daher ebenfalls einen Bromsubstituenten in Position 9 auf (siehe Abbildung 16).

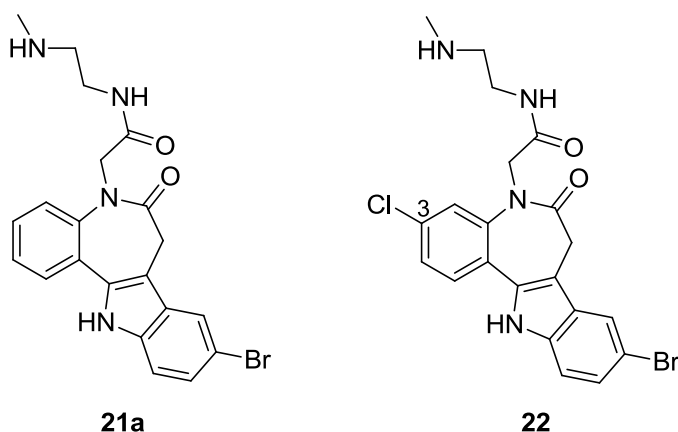
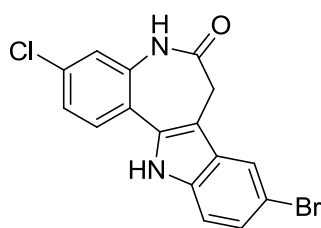


Abbildung 15: Struktureller Vergleich der Verbindungen **21a** und **22**.

Den bisher aktivsten TryS Inhibitor auf Paullonbasis stellt die Verbindung **22** dar (siehe Abbildung 15). Das Paullon-*N*⁵-acetamidderivat **22** inhibiert CfTryS mit einem IC₅₀ von 30 nM^{56, 78}. Der strukturelle Unterschied zwischen den Verbindungen **21a** und **22** ist lediglich der Chlorsubstituent in Position 3. Dieser scheint einen positiven Einfluss auf den Bindemodus in der TryS von *C. fasciculata* auszuüben. Zusätzlich zum Bromsubstituenten in Position 9 beinhaltet deswegen das für alle Derivatisierungen am Lactamstickstoff im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Paullongrundgerüst **20a** einen Chlorrest in Position 3 (siehe Abbildung 16).

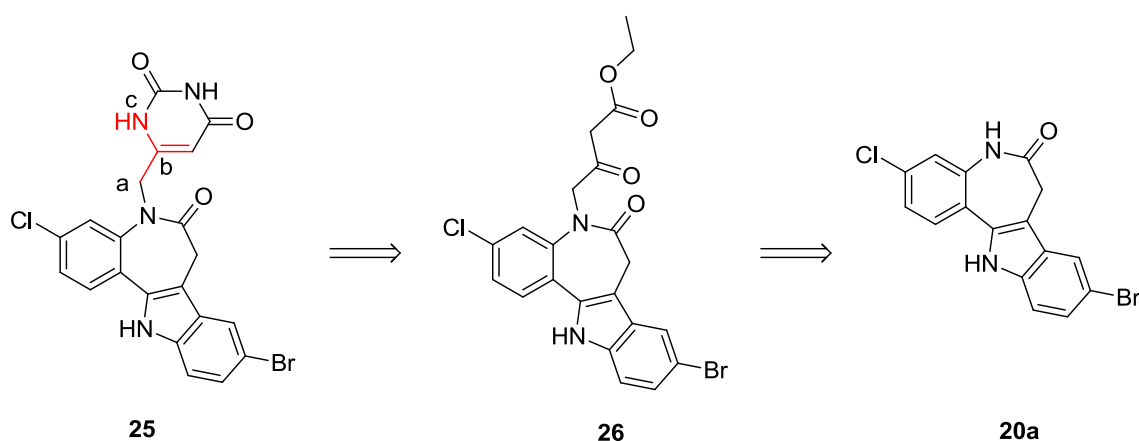


20a

Abbildung 16: 9-Brom-3-chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on, auch 3-Chlor-Kenpaullon (**20a**); das Paullongrundgerüst für Derivatisierungen in *N*⁵-Position.

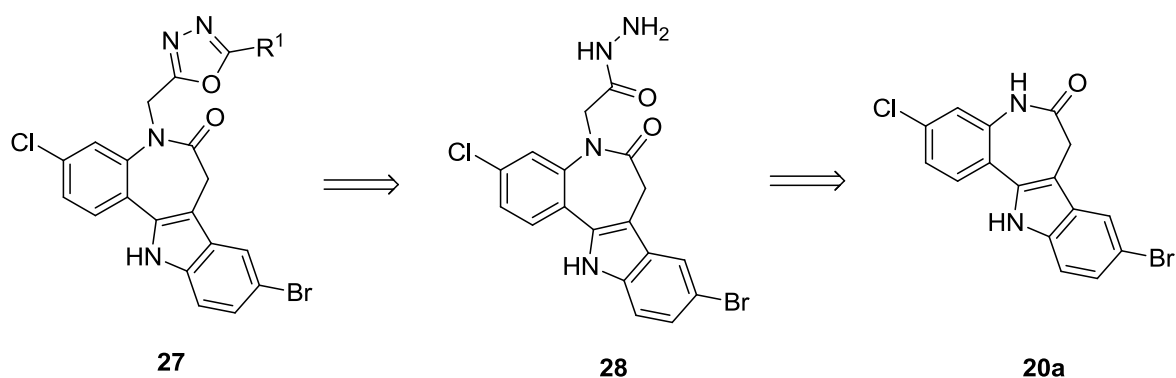
Anschließend an die Synthese des Paullongrundgerüstes **20a** sollten in dieser Arbeit zunächst weitere *N*⁵-Acetamid- und strukturverwandte *N*⁵-Essigsäure-esterderivate synthetisiert und auf deren inhibitorische Eigenschaften gegenüber der TryS verschiedener Spezies untersucht werden.

Ein weiteres Ziel war die Anbringung eines zyklischen, über eine Methylengruppe gebundenen Substituenten an die *N*⁵-Position des 3-Chlor-Kenpaullons (**20a**) (Position a der Verbindung **25** in Schema 1). Der Zyklus sollte eine möglichst planare Struktur aufweisen, an der an die Methylengruppe bindenden Position sp^2 hybridisiert vorliegen und mit Wasserstoffbrückenbindungsdonoren in Nachbarschaft zum sp^2 -hybridisierten Kohlenstoff versehen sein (Position b und c der Verbindung **25** in Schema 1).



Schema 1: Retrosyntheseschema für die Verbindung **25** mit einem zyklischen, über eine Methylengruppe (a) gebundenen Beispielsubstituenten in *N*⁵-Position des Grundgerüstes **20a** mit sp^2 -hybridisiertem Kohlenstoffatom (b) und Wasserstoffbrückenbindungsdonor (c).

Die ursprüngliche Idee zur Verwirklichung dieser Anforderungen bestand in der Einführung eines Acetessigsäureethylesterrestes in die N^5 -Position des Paullonggrundgerüsts **20a** mit anschließender Umsetzung der erhaltenen Verbindung **26** zu zyklischen Strukturen (siehe Schema 1). Dieser Syntheseansatz musste im Verlauf der Arbeit verworfen werden, da Schwierigkeiten bei der Synthese des Zwischenproduktes **26** auftraten. Eine alternative Idee zur Einführung planarer, über eine Methylengruppe gebundener Substituenten bestand darin, zunächst einen Hydrazidrest an das Paullonggrundgerüst **20a** anzuknüpfen. Das Produkt **28** sollte in anschließenden Zyklisierungsreaktionen zu Oxadiazolderivaten umgesetzt werden (siehe Schema 2).

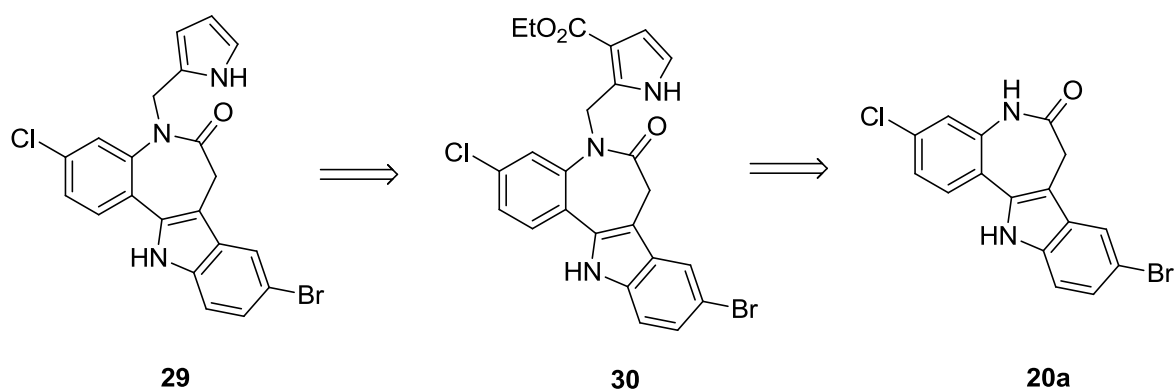


Schema 2: Retrosyntheschema für die Verbindung **27** über das Zwischenprodukt **28**;
 $R^1 = -CH_3$ oder $-H$.

Das Zwischenprodukt **28** sollte ebenfalls auf dessen antitrypanosomale Aktivität untersucht werden. Im Hinblick auf eine potentiell antileishmanielle Aktivität synthetisierten auch KHAN et al.⁷⁹ eine Reihe an Hydraziden und testeten diese *in vitro* an Leishmanien. Die von Ihnen durchgeführten Testungen zeigten, dass einige Hydrazide in Konzentrationen von 3.13 $\mu\text{g/mL}$ antileishmaniell Potential aufwiesen. Das Zwischenprodukt **28** sollte im zweiten Reaktionsschritt zu Oxadiazolderivaten umgesetzt werden, sodass in den resultierenden Endstrukturen ein zyklischer, über eine Methylengruppe gebundener Substituent an die N^5 -Position des Grundgerüsts **20a** angeknüpft ist. OZA et al.⁸⁰ beschreiben 1,3,4-Oxadiazol-2-thione als antifungal, antibakteriell und antileishmaniell und auch DERAPPE et al.⁸¹ berichten von nützlichen therapeutischen Eigenschaften der Oxadiazole in der Humanmedizin. Auf Grund der

genannten Eigenschaften sollte auch dieses Strukturelement mit dem Paullonggrundgerüst **20a** verknüpft werden.

Ein weiteres Teilprojekt bestand in der Anknüpfung eines Pyrrolderivates an den Lactamstickstoff des Paullons **20a** (siehe Schema 3). Auch die im Verlauf der Synthese entstehenden Zwischenprodukte sollten auf inhibitorische Aktivitäten gegenüber der TryS getestet werden.

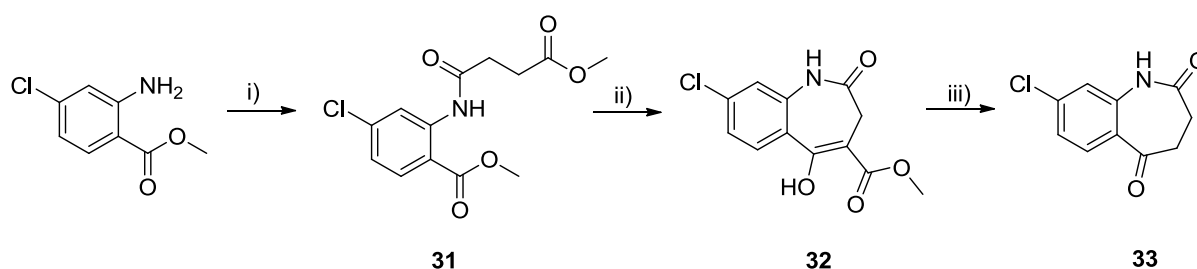


Schema 3: Retrosyntheseschema für die Verbindung **29**.

3 Synthese und Charakterisierung

3.1 Paullonsynthese

Zur Synthese aller im Rahmen dieses Projektes hergestellten Paullone wurde 8-Chlor-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**33**) als Ausgangssubstanz benötigt. Diese Verbindung konnte über eine dreistufige Synthese nach REICHWALD⁸² bzw. SATTLEGGER et al.⁸³ synthetisiert werden (siehe Schema 4).

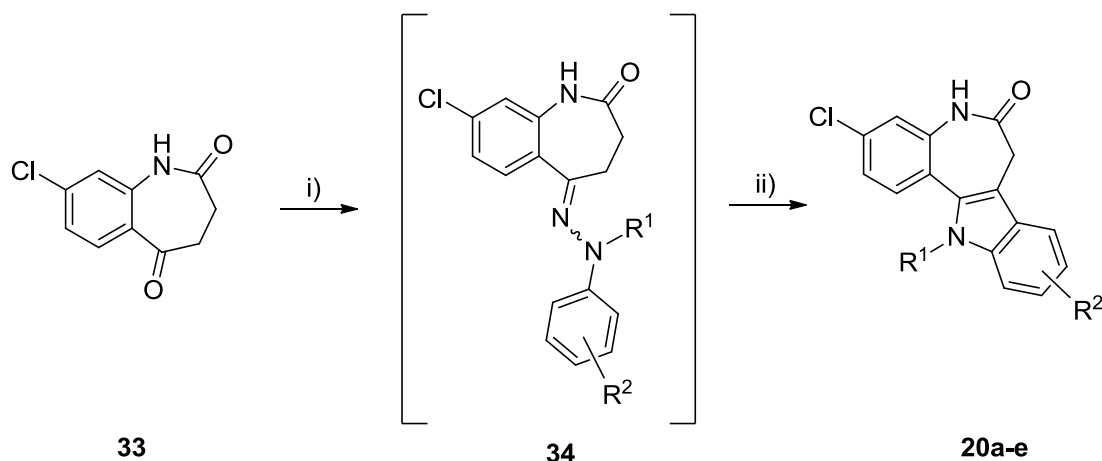


Schema 4: Synthese von 8-Chlor-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**33**)

Reaktionsbedingungen: i) Bernsteinsäuremethylesterchlorid, Pyridin, Toluol, 0 → 80 °C, 2 h;
ii) KO^tBu, DMF, Toluol, 0 → 80 °C, 3.5 h; iii) DMSO/H₂O 9:1, 150 °C, 6 h.

Im ersten Reaktionsschritt wurde der kommerziell erworbene 2-Amino-4-chlorbenzoesäuremethylester nach einer Vorschrift von REICHWALD⁸² mit Bernsteinsäuremethylesterchlorid unter Zusatz von Pyridin als Hilfsbase zum Amid **31** umgesetzt. Durch die daran anschließende Dieckmann-Esterkondensation konnte der enolische Ester **32** gewonnen werden. Das gewünschte Produkt **33** wurde im dritten Reaktionsschritt nach SATTLEGGER et al.⁸³ durch eine Dealkoxycarbonylierung von Verbindung **32** in wässrigem Dimethylsulfoxid erhalten.

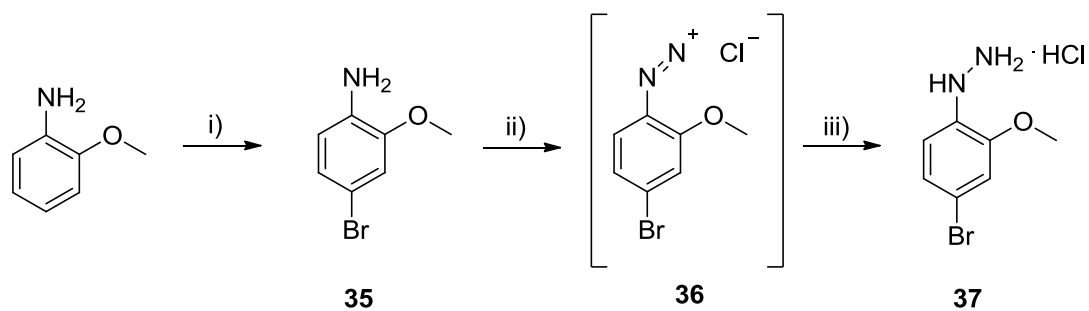
Gemäß einer Vorschrift von KUNICK⁸⁴ wurde das 8-Chlor-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**33**) mit unterschiedlich substituierten Phenylhydrazinen bzw. Phenylhydrazin-Hydrochloriden in einer säurekatalysierten Fischer-Indol-Synthese zu Paullonen umgesetzt (siehe Schema 5). Das als Zwischenstufe entstehende Hydrazon **34** wurde dabei nicht isoliert, sondern durch Zugabe von konzentrierter Schwefelsäure zu dem Reaktionsansatz zu den Produkten **20a-e** umgesetzt (siehe Tabelle 2).



Schema 5: Paullonsynthese mittels säurekatalysierter Fischer-Indol-Synthese
 Reaktionsbedingungen: i) Phenylhydrazin bzw. Phenylhydrazin-Hydrochlorid und NaOAc, Eisessig, 70 °C, 1 h; ii) Eisessig, konz. H₂SO₄, 70 °C, 1 h.

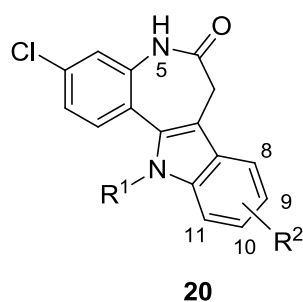
Die zur Synthese der Paullone eingesetzten Phenylhydrazine bzw. Phenylhydrazin-Hydrochloride konnten mit Ausnahme von (4-Brom-2-methoxyphenyl)hydrazin-Hydrochlorid (**37**) kommerziell erworben werden. Nach einer Vorschrift von TOLLE⁸⁵ konnte das Arylhydrazin **37** durch eine Diazotierung des zuvor bromierten *o*-Anisidins (**35**) mit anschließender Reduktion hergestellt werden (siehe Schema 6). Das entstehende Diazoniumion **36** wurde nicht isoliert.

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Paullone sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Verbindung **20a**, das 3-Chlor-Kenpaullon, stellt die Ausgangsverbindung für alle im Folgenden durchgeführten Derivatisierungen am Lactamstickstoff dar.


 Schema 6: Synthese von (4-Brom-2-methoxyphenyl)hydrazin-Hydrochlorid (**37**)

Reaktionsbedingungen: i) Br_2 , Eisessig, $12 \rightarrow 14^\circ\text{C}$; ii) NaNO_2 , HCl , 0°C ; iii) $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, HCl (g) .

Tabelle 2: Nach KUNICK⁸⁴ synthetisierte Paullone **20a-e** mit Variation der Substituenten R^1 und R^2 .



20	R^1	R^2
a	-H	9-Br
b	-H	9- <i>tert</i> -Butyl
c	-CH ₃	-H
d	-H	8-Cl, 10-Cl
e	-H	9-Br, 11-OCH ₃

3.2 Massenspektrometrische Besonderheiten synthetisierter Paullone

Alle in dieser Arbeit hergestellten Endprodukte wurden u. a. mittels Massenspektrometrie charakterisiert. Die in organischen Verbindungen vorkommenden Elemente sind meist keine Reinelemente, sondern stellen natürlich vorkommende Isotopengemische dar. Neben Elementen mit einem stark überwiegenden Isotop wie Wasserstoff (^1H), Stickstoff (^{14}N) und Sauerstoff (^{16}O) findet sich in allen in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen mindestens ein Element mit zwei häufigen Isotopen, beispielsweise Chlor (^{35}Cl , ^{37}Cl) und Brom (^{79}Br , ^{81}Br).

Verbindung **20a**, und damit auch alle weiteren Derivate des 3-Chlor-Kenpaullons, enthält sowohl Chlor als auch Brom. Daher wird der Molekülionenpeak in den Massenspektren dieser Verbindungen von mehreren Isotopenpeaks begleitet, die bei höheren Massen gefunden werden. Die Intensitäten der Peaks gleicher Masse überlagern sich, wodurch sich charakteristische Isotopenverteilungsmuster ergeben⁸⁶⁻⁸⁷.

In Abbildung 17 ist im obersten Spektrum das Massenspektrum der Verbindung **20a** mit den Peaks A-G dargestellt. Gefunden wurde eine Überlagerung der Isotopenmuster des Molekülions $[\text{M}]^{+\bullet}$ und des $[\text{M-H}]^+$ -Ions. Um die Überlagerung der Peaks zu verdeutlichen, wurde in der Mitte der Abbildung eine Simulation des Spektrums des Molekülionenpeaks $[\text{M}]^{+\bullet}$ aufgetragen, unten eine Simulation des $[\text{M-H}]^+$ -Peaks. Werden diese überlagert, resultiert das von Verbindung **20a** gemessene Massenspektrum. Die Peaks A-G sind zur Verdeutlichung in Tabelle 3 in ihre Überlagerungsbestandteile zerlegt.

Auffällig ist, dass die Intensitäten, die sich durch die einfache gedankliche Überlagerung der simulierten Spektren von $[\text{M}]^{+\bullet}$ und $[\text{M-H}]^+$ ergeben, nicht denen im gemessenen Spektrum (Abbildung 17 oben) entsprechen. Um die vorliegenden Intensitäten genauer zu untersuchen, wurden Simulationen von Spektren der überlagerten $[\text{M}]^{+\bullet}$ und $[\text{M-H}]^+$ -Peaks vorgenommen, wobei das Verhältnis von $[\text{M}]^{+\bullet}$ -Peak zu $[\text{M-H}]^+$ -Peak manuell variiert wurde, bis die experimentell gefundene Intensitätenverteilung vorlag (Abbildung 18). Im Spektrum von Verbindung **20a** ist demnach das Verhältnis vom $[\text{M}]^{+\bullet}$ -Peak zum $[\text{M-H}]^+$ -Peak zwei zu eins.

Tabelle 3: Aufschlüsselung der überlagerten Peaks im Massenspektrum der Verbindung **20a**.

	Peak	Isotopenmuster
A	$[M-H]^+$	$^{12}\text{C}^{79}\text{Br}^{35}\text{Cl}$
B	$[M]^{+\bullet}$	$^{12}\text{C}^{79}\text{Br}^{35}\text{Cl}$
	$[M-H]^+$	$^{13}\text{C}^{79}\text{Br}^{35}\text{Cl}$
C	$[M]^{+\bullet}$	$^{13}\text{C}^{79}\text{Br}^{35}\text{Cl}$
	$[M-H]^+$	$^{12}\text{C}^{79}\text{Br}^{37}\text{Cl}$, $^{12}\text{C}^{81}\text{Br}^{35}\text{Cl}$
D	$[M]^{+\bullet}$	$^{12}\text{C}^{79}\text{Br}^{37}\text{Cl}$, $^{12}\text{C}^{81}\text{Br}^{35}\text{Cl}$
	$[M-H]^+$	$^{13}\text{C}^{79}\text{Br}^{37}\text{Cl}$, $^{13}\text{C}^{81}\text{Br}^{35}\text{Cl}$
E	$[M]^{+\bullet}$	$^{13}\text{C}^{79}\text{Br}^{37}\text{Cl}$, $^{13}\text{C}^{81}\text{Br}^{35}\text{Cl}$
	$[M-H]^+$	$^{12}\text{C}^{81}\text{Br}^{37}\text{Cl}$
F	$[M]^{+\bullet}$	$^{12}\text{C}^{81}\text{Br}^{37}\text{Cl}$
	$[M-H]^+$	$^{13}\text{C}^{81}\text{Br}^{37}\text{Cl}$
G	$[M]^{+\bullet}$	$^{13}\text{C}^{81}\text{Br}^{37}\text{Cl}$

Die mit vier Nachkommastellen versehenen Massenzahlen der Spektren in Abbildung 17 zeigen, dass die Massenunterschiede zwischen einzelnen $[M]^{+\bullet}$ und $[M-H]^+$ -Peaks sehr klein sind. Diese Unterschiede vermag die Massenspektrometrie mit einer Auflösung von 2000, wie sie in der Praxis verwendet wurde, nicht zu detektieren. Erst ab einer Auflösung um die 100 000 konnten die Peaks in Simulationen voneinander getrennt werden. Zur Veranschaulichung wurde in Abbildung 19 Peak B aus dem Spektrum von Verbindung **20a** mit einer Auflösung von 10 000 (oben) und 100 000 (unten) simuliert. Bei einer Auflösung von 10 000 findet noch keine Trennung der überlagerten $[M]^{+\bullet}$ und $[M-H]^+$ -Peaks statt. Wird die Auflösung auf 100 000 erhöht, liegen zwei getrennte Peaks vor.

C:\Xcalibur\data\XLT bis 06000\xt05047
cm

28.07.2011 14:06:21
C₁₆H₁₀BrClN₂O - mw 359.97

KUNICK
R. Korn, KuRK 19

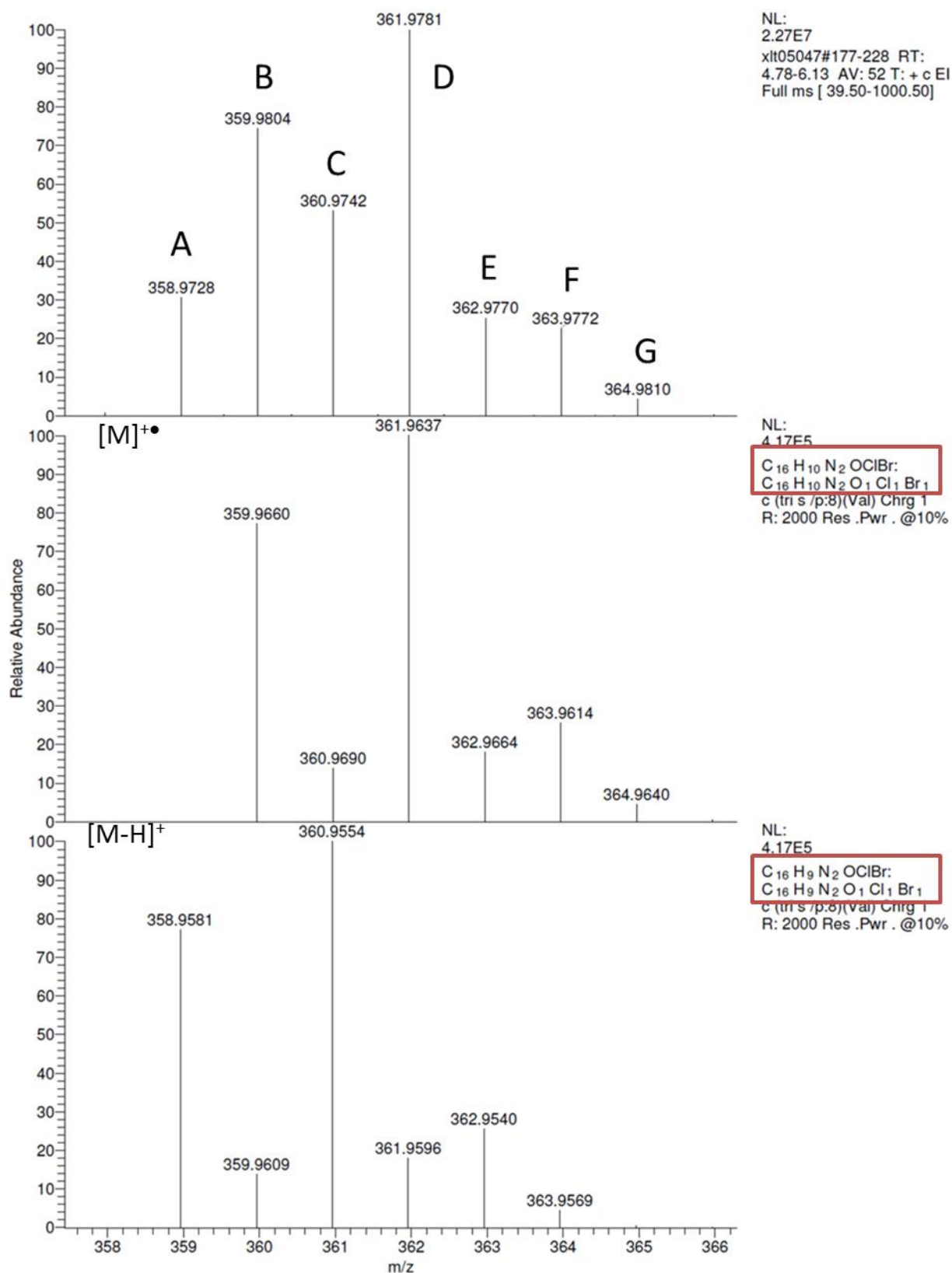


Abbildung 17: Massenspektren der Verbindung **20a**; gefundene Überlagerung von [M]⁺• und [M-H]⁺ (oben), simuliertes Spektrum von [M]⁺• (mittig) und simuliertes Spektrum von [M-H]⁺ (unten).

C:\Xcalibur\data\XLT bis 06000\slt05047
cm

 28.07.2011 14:06:21
C₁₆H₁₀BrClN₂O - mw 359.97

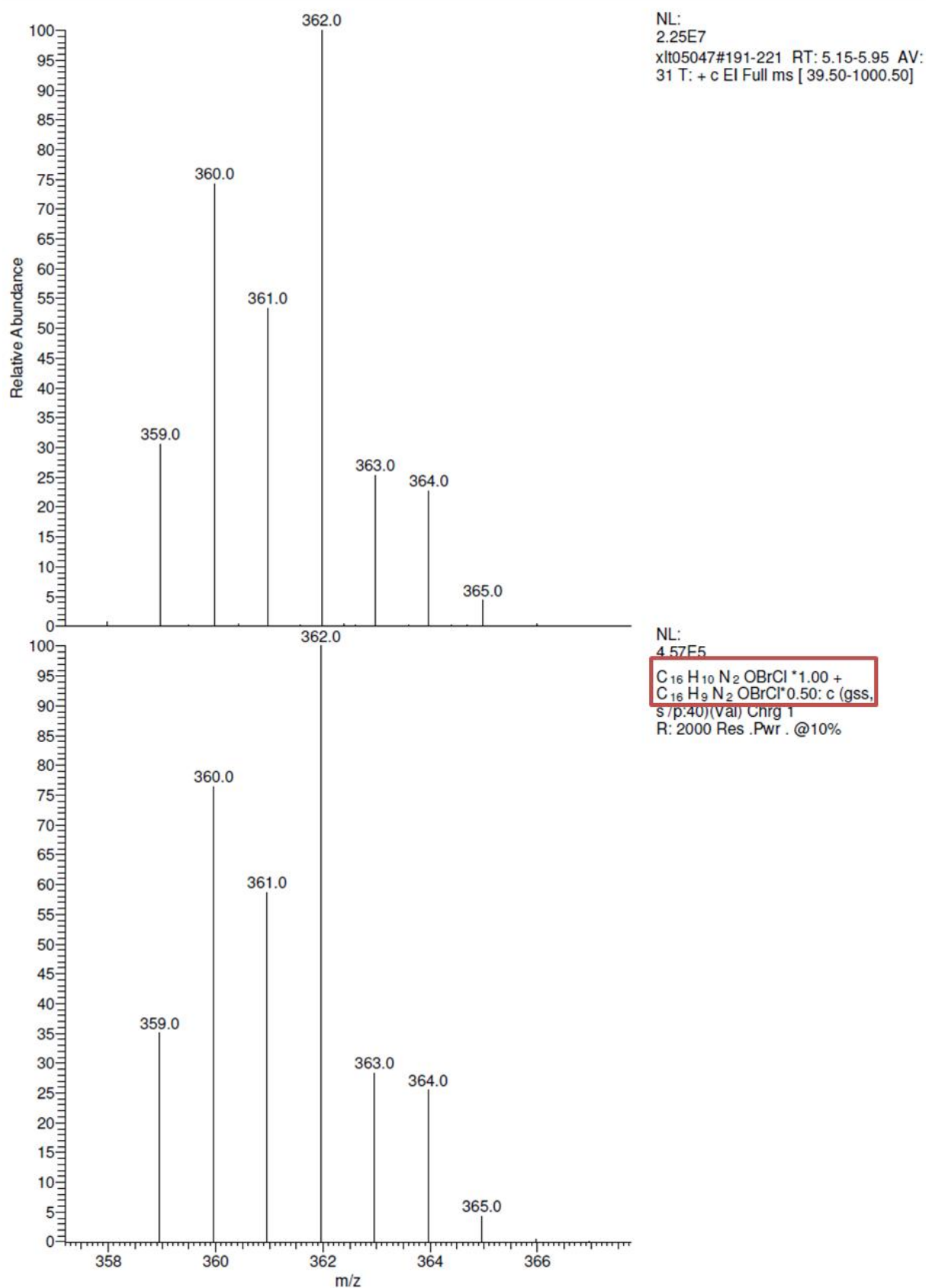
 KUNICK
R. Korn, KuRK 19


Abbildung 18: Massenspektren der Verbindung **20a**; gefundene Überlagerung $[M]^{+•}$ und $[M-H]^{+}$ (oben), simulierte Überlagerung von $[M]^{+•}$ und $[M-H]^{+}$ mit einem Verhältnis von 2:1.

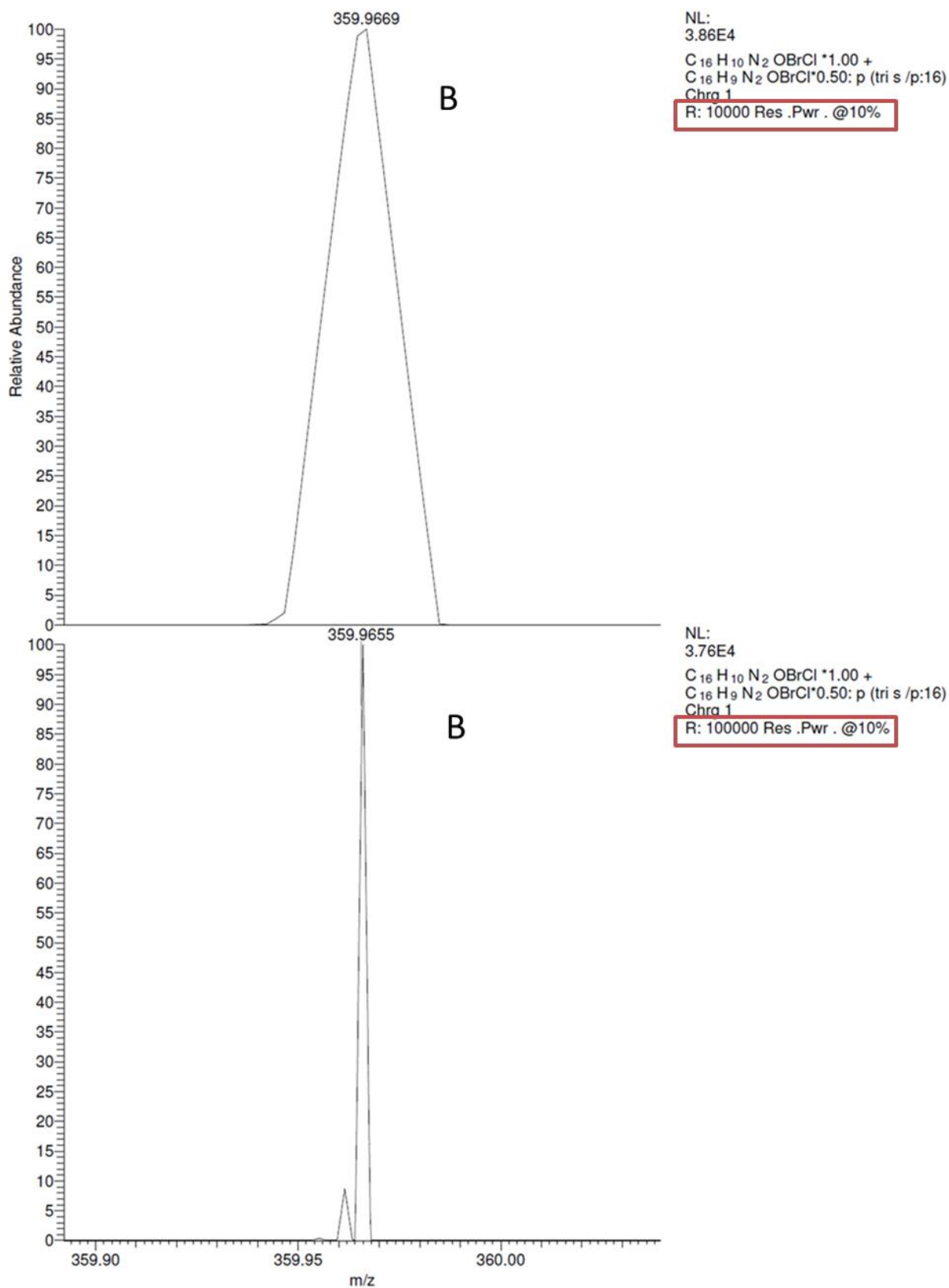


Abbildung 19: Ausschnitt aus dem simulierten Spektrum des $[M]^+$ der Verbindung **20a**: mit einer Auflösung von 10 000 (oben); mit einer Auflösung von 100 000 (unten).

Bei der Ionenerzeugung mittels Elektronenstoßionisation wird das Molekül im Gaszustand mit Elektronen einer Energie von 70 eV beschossen, wodurch aus diesem ein Elektron herausgeschossen wird und somit ein positiv geladenes Molekülion entsteht. Das Ionisierungspotential, also die notwendige Energie zur Entfernung eines Elektrons aus einer organischen Verbindung, liegt bei ca. 7 bis 15 eV. Von den ursprünglich eingesetzten 70 eV verbleibt nach der Ionisierung ein bestimmter Anteil im Molekül. Das durch den Elektronenbeschuss angeregte Molekülion kann Fragmentierungsreaktionen eingehen, wenn die verbliebene Energie mindestens der Aktivierungsenergie einer Zerfallsreaktion entspricht. Im Folgenden wird davon ausgegangen, dass zumindest im Moment des Eintritts der Fragmentierungsreaktion die Ladung lokalisiert ist. Die Beschreibung aller Fragmentierungsreaktionen beruht auf Annahmen, die sich aus empirischen Erhebungen vieler Einzelmessungen ergeben haben. Die formellen Reaktionsgleichungen stellen deshalb lediglich Vorschläge denkbarer Fragmentierungen dar^{86, 88}.

Bei der Auswertung der massenspektrometrischen Daten der hergestellten Paullone war auffällig, dass in allen Spektren N^{δ} -unsubstituierter Paullone das Fragment $[M-29]^+$ enthalten war. Ein charakteristisches Fragment mit $m = 29$ ist das Formaldehydfragment CHO^{\bullet} . Durch dessen Abspaltung wird, wie in Abbildung 20 beispielhaft an Verbindung **20c** dargestellt, ein aromatisierter Sechsring erhalten, sodass das gesamte Molekül durchkonjugiert vorliegt. Die energetisch günstige Ringverkleinerung vom Sieben- zum Sechsring und das Erreichen eines aromatischen Zustandes machen diese postulierte Zerfallssequenz sehr wahrscheinlich.

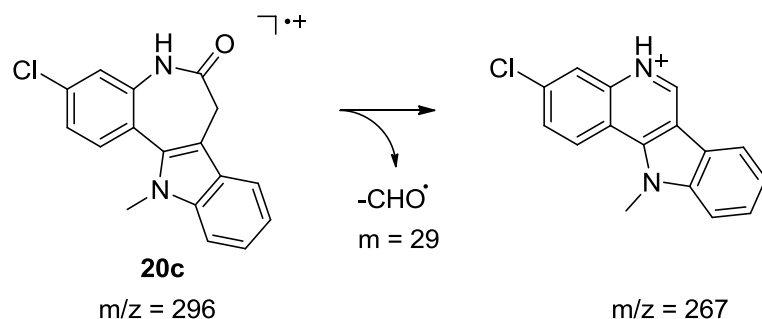


Abbildung 20: Postulierte Zerfallssequenz von N^{δ} -unsubstituierten Paullonen als Folge der Elektronenstoßionisation am Beispiel der Verbindung **20c**.

Die errechnete Differenz der hochaufgelösten Massen des Molekülionenpeaks und des $[M-29]^+$ -Peaks der Verbindung **20c** beträgt 29.00330. Die theoretisch errechnete Masse für das Formaldehydfragment liegt bei $m = 29.00274$, wodurch die postulierte Fragmentierung bekräftigt wird.

3.3 N^5 -Substitution am 3-Chlor-Kenpaullon

Eine Reihe N^5 -substituierter Paullone von FLOHÉ⁶⁰, STUHLMANN et al.⁷⁷ und JÄGER et al.⁷⁸ zeigten bereits in nanomolaren Konzentrationen inhibitorische Eigenschaften gegenüber der Trypanothionsynthetase (TryS), was sie als potentiell trypanozide Wirkstoffe qualifiziert. Die Substitution am Lactam-Stickstoff behindert zudem die von Paullonen bekannte inhibitorische Wirkung gegenüber Protein-kinasen. Daraus resultiert ein potentiell selektiver TryS-Inhibitor ohne störende, mit Nebenwirkungen behaftete Inhibition von menschlichen Kinasen⁶⁰. Daher konzentrierte sich die Synthese neuer Verbindungen im Rahmen dieser Arbeit auf N^5 -substituierte Paullone.

SCHULTZ⁸⁹ und BECKER⁹⁰ beschäftigten sich mit der selektiven Alkylierung des Lactamstickstoffs in Position 5 von Paullonen gegenüber dem Indolstickstoff in Position 12.

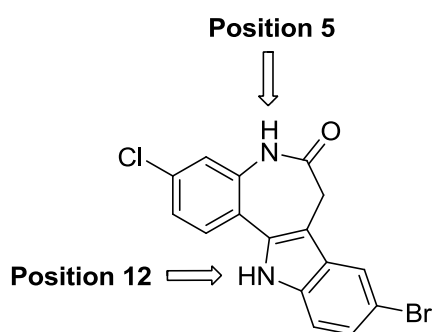


Abbildung 21: N,H-acide Positionen des 3-Chlor-Kenpaullons **20a**.

Diese Reaktionen führten sie in getrocknetem Tetrahydrofuran unter Zugabe von 0.5-1.0 Äquivalenten Natriumhydrid und 1.5 Äquivalenten des als Alkylierungsmittel verwendeten Halogenalkans durch. BECKER⁹¹ beschreibt unter den genannten

Bedingungen das Auftreten von dialkylierten Nebenprodukten, was sich nachteilig auf die Ausbeute und eine dann anstehende Reinigung des Endproduktes auswirkt.

In einer weiteren Vorschrift für eine selektive Substitution eines Paullons in 5-Position von STUHLMANN et al.⁷⁷ wurden zum Eduktpaullon 1.1 Äquivalente sowohl der Base als auch des Halogenalkans hinzugegeben. Des Weiteren wurde für die Deprotonierung Kalium-*tert*-butylat anstelle des Natriumhydrids eingesetzt.

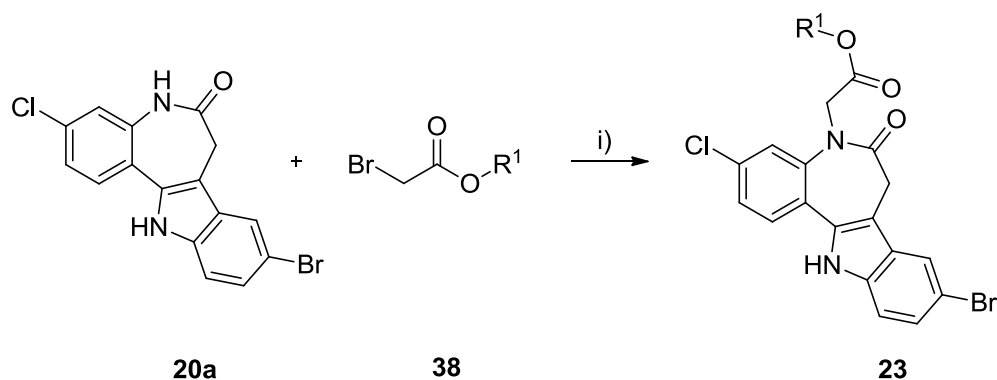
Aus den Vorschriften von BECKER⁹⁰, SCHULTZ⁸⁹ und STUHLMANN et al.⁷⁷ wurde eine allgemeine Arbeitsvorschrift erstellt, die für jeden eingesetzten Substituenten neu optimiert wurde. Alle Reaktionen wurden demnach in getrocknetem Tetrahydrofuran unter Zugabe von 1.10-1.40 Äquivalenten der Base Kalium-*tert*-butylat und 1.10-2.00 Äquivalenten des jeweiligen Halogenalkans durchgeführt.

Eine der nach der erstellten allgemeinen Arbeitsvorschrift im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Substanzklassen stellen die in Tabelle 4 aufgeführten Paullon-*N*⁵-essigsäureester (**23a-c**) dar.

Tabelle 4: Eingesetzte Äquivalente der Reagenzien für die Synthesen der Paullon-*N*⁵-essigsäureester **23a-c** nach Schema 7.

23	R¹	Äquivalente KO^tBu	Äquivalente Bromalkan 38^{a)}	Ausbeute [%]
a	-CH ₃	1.11	1.90	41
b	-C ₂ H ₅	1.21	1.78	47
c	- <i>tert</i> -Butyl	1.18	1.18	56

a) **38a**: Bromessigsäuremethylester; **38b**: Bromessigsäureethylester; **38c**: Bromessigsäure-*tert*-butylester.

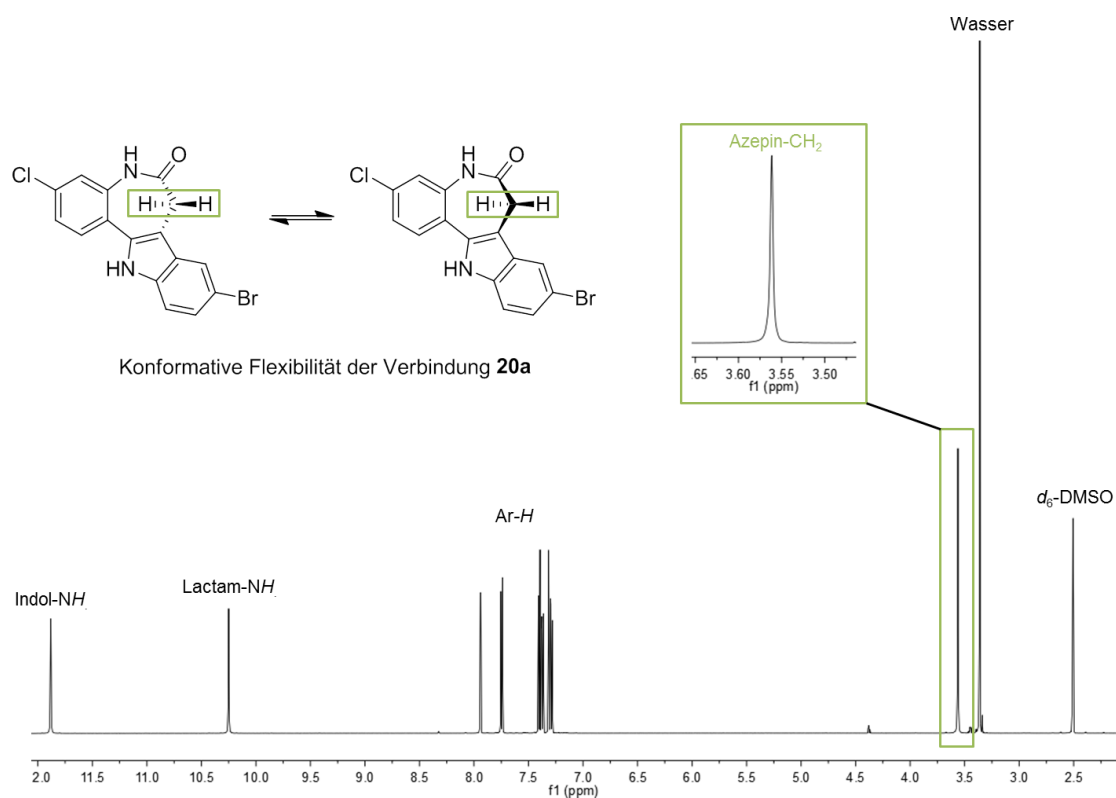
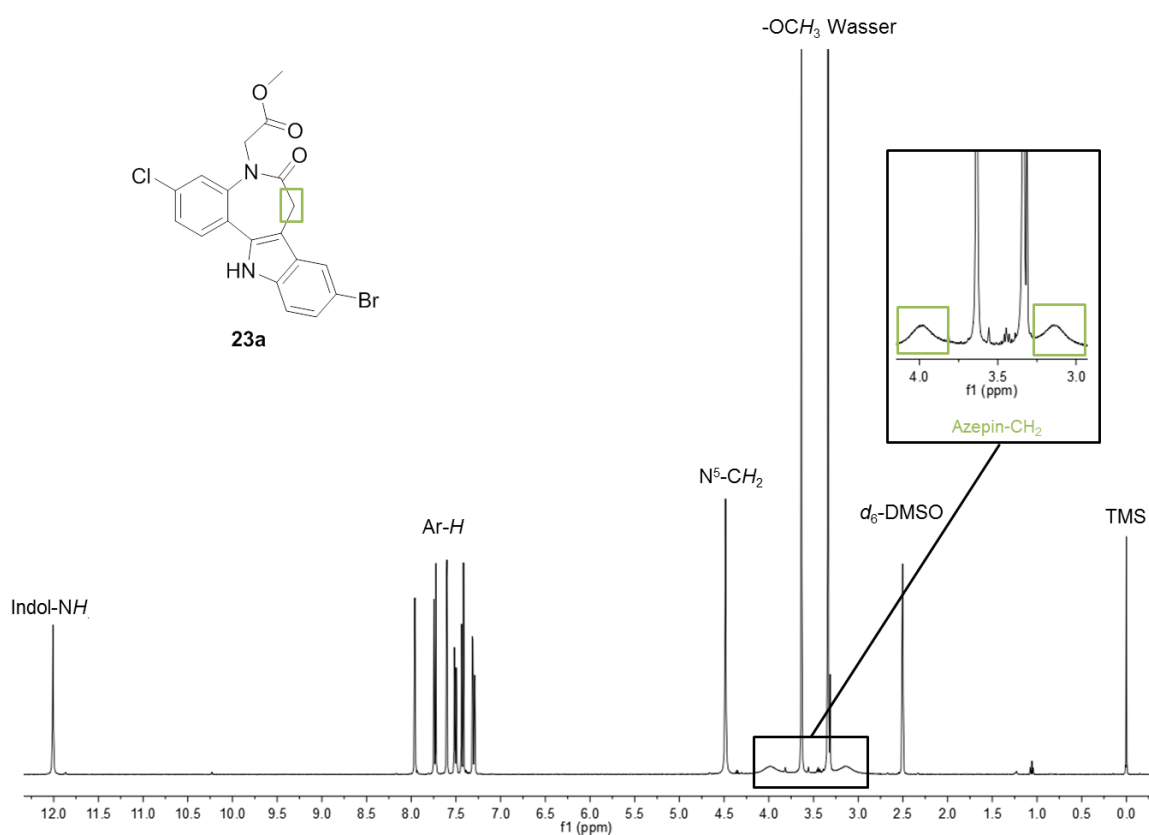


Schema 7: Synthese von Paullon-*N*⁵-essigsäureestern **23** mit variierenden Resten R¹ (siehe Tabelle 4).

Reaktionsbedingungen: i) THF, KO^tBu, RT.

Die Verbindungen **23a-c** konnten in moderaten Ausbeuten um die 50% hergestellt werden. Deren ¹H-kernresonanzspektroskopische Untersuchungen weisen ein schon von BECKER⁹¹ und SCHULTZ⁹² beschriebenes Aufspaltungsmuster auf. Auf Grund der konformativen Flexibilität der am Lactam- und Indolstickstoff unsubstituierten Paullone sind die azepinischen Protonen der CH₂-Gruppe chemisch äquivalent. Die Ringinversionsprozesse der Wannenkonformation weisen nur eine geringe Energiebarriere auf, wodurch ein schneller Konformationswechsel stattfindet. Daher sind die Methylenprotonen des Azepinrings in allen ¹H-Spektren von in Position 5 und 12 unsubstituierten Paullonen als scharfes Singulett zu sehen (siehe Abbildung 22)⁹¹⁻⁹³.

Im Falle der in dieser Arbeit hergestellten *N*⁵-substituierten Derivate ist die Energiebarriere für den Konformationswechsel erhöht, wodurch dieser verlangsamt abläuft. Durch die eingeschränkte intramolekulare Dynamik werden die Azepinmethylenprotonen chemisch inäquivalent und erscheinen im ¹H-Spektrum als aufgespaltene Signale. Resultierend aus der Kopplung der nicht äquivalenten Methylenprotonen miteinander sind zwei Dubletts im ¹H-Spektrum zu erwarten. Zu sehen sind im Falle der Esterderivate **23a-c** aber zwei breite Singulett (siehe Abbildung 23). Diese stellen ein Durchschnittssignal dar, welches durch eine Messung nahe der Koaleszenztemperatur zustande kommt. In Niedrigtemperaturmessungen oder bei Substanzen mit stärker eingeschränkter konformativer Flexibilität wären zwei Dubletts zu erwarten⁸⁶.


 Abbildung 22: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **20a** mit dargestellter konformativer Flexibilität.

 Abbildung 23: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **23a**; Aufspaltung des Azebinsignals durch eingeschränkte intramolekulare Dynamik.

In den Massenspektren der Verbindungen **23a-c** konnte neben den Molekülionenpeaks $[M]^{+\bullet}$ mindestens ein weiteres Fragment bei $m/z = 361$ gefunden werden. Auf Grund des bei den im Rahmen dieses Projektes synthetisierten Paullon- N^5 -essigsäureestern **23a-c** charakteristisch auftretenden Fragmentes $[M-X]^+ = 361$ liegt die Vermutung nahe, dass die Alkylbindung am N^5 -Stickstoff fragmentiert (siehe Abbildung 24). X steht hier für die unterschiedlichen Massen der Esterfragmente.

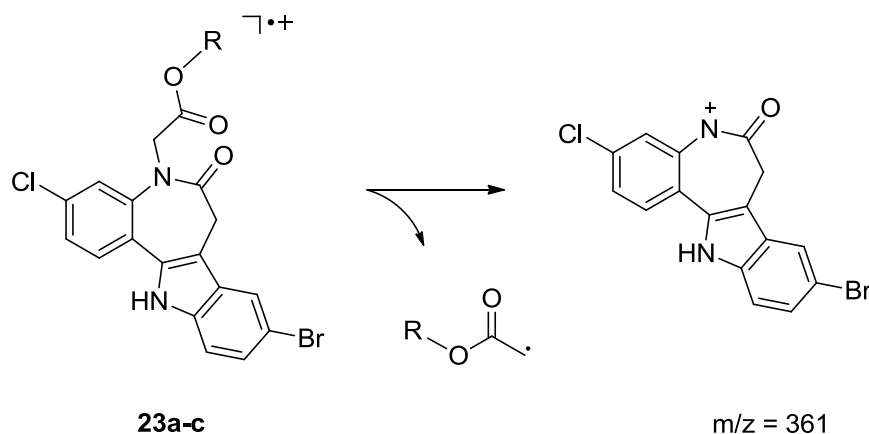
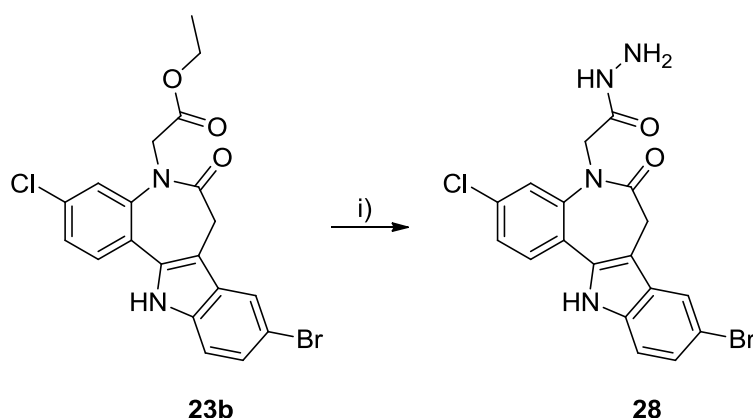


Abbildung 24: Postulierte Zerfallssequenz von **23a-c** als Folge der Elektronenstoßionisation.

Durch die Umsetzung von Verbindung **23b** mit Hydrazinhydrat nach BOSTROM et al.⁹⁴ konnte das Hydrazid **28** hergestellt werden (siehe Schema 8).



Schema 8: Synthese von 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)acetohydrazid (**28**)

Reaktionsbedingungen: i) Hydrazinhydrat, Ethanol, 8 h Δ , dann 12 h RT.

Zur Optimierung der Ausbeute dieser Synthese wurde sowohl das Lösungsmittel als auch die Anzahl eingesetzter Äquivalente des Hydrazinhydrates variiert. In Tabelle 5 ist eine Übersicht der Reaktionsansätze dargestellt. Alle Ansätze wurden acht Stunden zum Rückfluss erhitzt und anschließend weitere zwölf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zu erkennen ist, dass bei der Durchführung in Ethanol unter Verwendung von 20 Äquivalenten des Hydrazinhydrates die maximale Ausbeute von 75% erreicht wurde, sodass diese Reaktionsbedingungen in den folgenden Synthesen der Verbindung **28** angewandt wurden.

Tabelle 5: Optimierung der Synthese von 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo-[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)acetohydrazid (**28**) unter Variation des Lösungsmittels und der eingesetzten Anzahl an Äquivalenten des Hydrazinhydrates.

Lösungsmittel	Äquivalente Hydrazinhydrat	Ausbeute [%]
Ethanol	2	0
Ethanol	20	75
1-Butanol	2	0
1-Butanol	20	67
-	als LM eingesetzt	30

Mittels Kernresonanzspektroskopie wurde ein ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **28** aufgenommen. In diesem überlagerten sich mehrere Signale, weshalb keine eindeutige Aussage über die Zuordnung der Peaks zu den Protonen im Molekül möglich war (siehe Abbildung 25, unteres Spektrum). Vermutet wurde, dass das sehr breite Multipllett bei 3.75-4.50 ppm mit einem Integral von 5 Protoneneinheiten neben den Signalen für die $\text{N}^5\text{-CH}_2$ -Gruppe auch den Peak für die NH_2 -Gruppe des Hydrazids und die Hälfte des Azepin- CH_2 -Signals beinhaltet. Um diese Vermutung zu untermauern, wurden mit Hilfe eines D_2O -Experimentes die Indol- und Aminprotonen bis auf kleine Restsignale aus dem Spektrum eliminiert (siehe Abbildung 25, oberes Spektrum). Durch den Zusatz von D_2O zu der in d_6 -DMSO

gelösten Substanz findet ein Wasserstoff-Deuterium-Austausch an allen Aminfunktionen statt, sodass die entsprechenden Peaks bei einer erneuten Messung verschwunden sind. In dem Spektrum des D₂O-Experimentes in Abbildung 25 oben verfügt das Multiplett bei einer Verschiebung von 3.75-4.50 ppm über ein Integral von 3 Protoneneinheiten. Das ist ein Integrationsunterschied von 2 Protoneneinheiten zu der vorherigen Messung, was dem Integral der Hydrazid-NH₂-Protonen entspricht. Der Peak der Hydrazid-NH₂-Protonen mit einem Integral von 2 Protoneneinheiten wird demnach von Signalen der N⁵- und Azepin-CH₂-Gruppen überlagert. Mit Hilfe des D₂O-Experimentes konnten alle Peaks zugeordnet und die Synthese von Verbindung **28** bestätigt werden. Bei massenspektrometrischen Untersuchungen wurde zudem der Molekülionenpeak bei m/z = 434 detektiert, was die Darstellung der Verbindung **28** beweist.

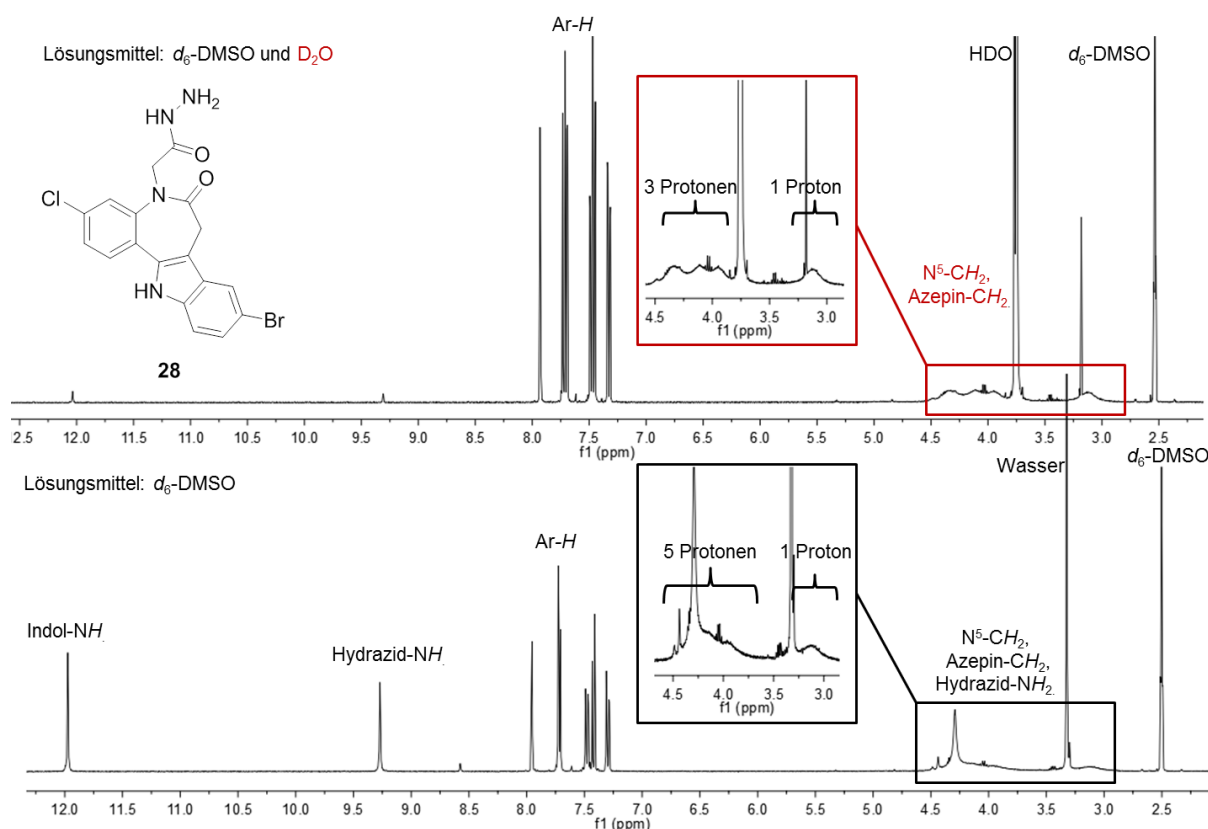
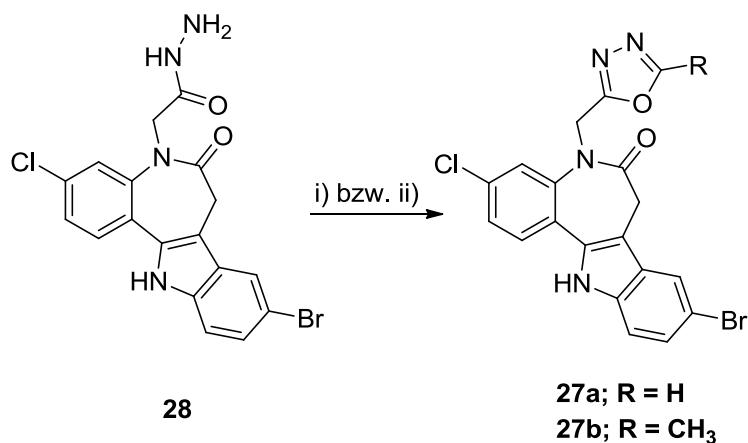


Abbildung 25: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **28** im Lösungsmittel d₆-DMSO (unten) und unter Zusatz von D₂O zu dem in d₆-DMSO gelösten Produkt **28** (oben).

Im Rahmen dieses Projektes wurde Verbindung **28** mit Orthoestern umgesetzt, um die Verbindungen **27a** und **27b** herzustellen.



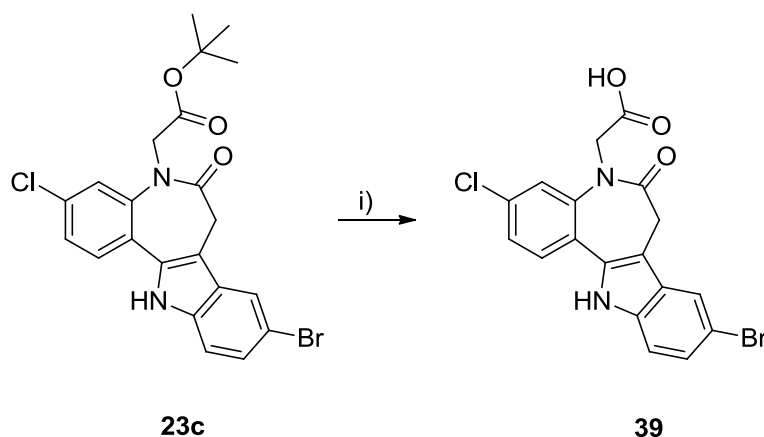
Schema 9: Syntheseversuch von Oxadiazolderivaten R = H oder CH₃

Reaktionsbedingungen: i) **27a**: Triethylorthoformiat, (Eisessig,) Δ ; ii) **27b**: Triethylorthoacetat, (Eisessig,) Δ .

Die in Schema 9 dargestellte Reaktion des Hydrazids **28** mit Orthoestern führte zu nicht trennbaren Produktgemischen. Nach Vorschriften von KUDELKO⁹⁵ und BROZEWICZ et al.⁹⁶ wurde das Hydrazin **28** in Eisessig unter Zugabe von sechs Äquivalenten des Orthoesters refluxiert, bis dünnschichtchromatographische Untersuchungen eine vollständige Umsetzung des Eduktes zeigten. Massenspektrometrische Untersuchungen der Produktgemische zeigten zwar die Molekülionenpeaks, kernresonanzspektroskopische Untersuchungen ließen aber auf die Entstehung vieler Nebenprodukte schließen. Die Entfernung dieser aus dem Produktgemisch mittels Säulenchromatographie und Umkristallisation gelang nicht. Ein sauberes Produkt konnte nicht isoliert werden.

Bei einer weiteren durchgeführten Synthesemethode nach DERAPPE⁸¹, in welcher die Orthoester als Lösungsmittel im starken Überschuss zugegeben wurden, traten ebenfalls Produktgemische auf. Die Isolierung der sauberen Produkte **27a** und **27b** gelang auch aus diesen Ansätzen nicht.

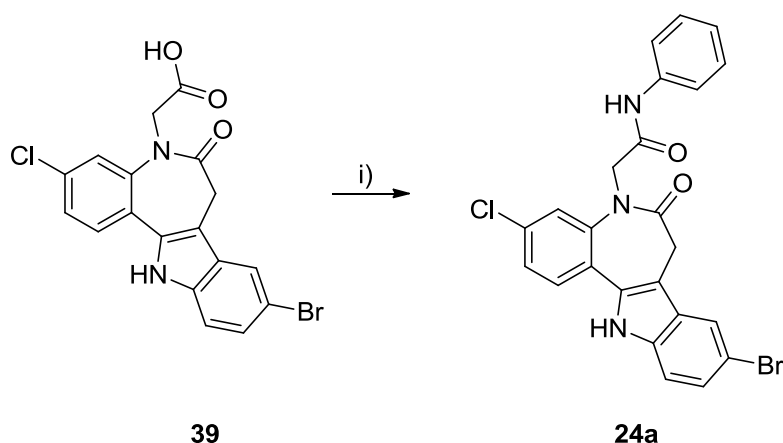
Zur Synthese neuer Paullon- N^5 -acetamiderivate wurde zunächst 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**39**) aus Verbindung **23c** durch Zugabe von Trifluoressigsäure in Dichlormethan hergestellt (siehe Schema 10).



Schema 10: Synthese von 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**39**)

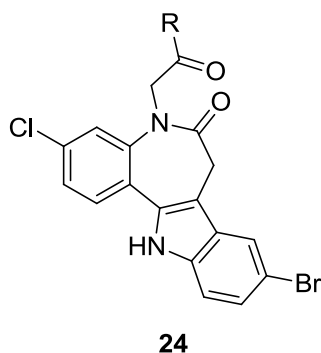
Reaktionsbedingungen: i) TFA, CH₂Cl₂, 20 h, RT.

Nach einer Synthesevorschrift von STUHLMANN et al.⁷⁷ wurde im nächsten Schritt eine Reihe von N^5 -substituierten Paullonen mit Acetamidstruktur hergestellt, wobei die in Schema 11 dargestellte Synthese von Verbindung **24a** den Syntheseweg für die Verbindungen **24a-h** und **24l** repräsentiert (siehe Tabelle 6)⁷⁷.



Schema 11: Synthese von 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-phenylacetamid (**24a**)

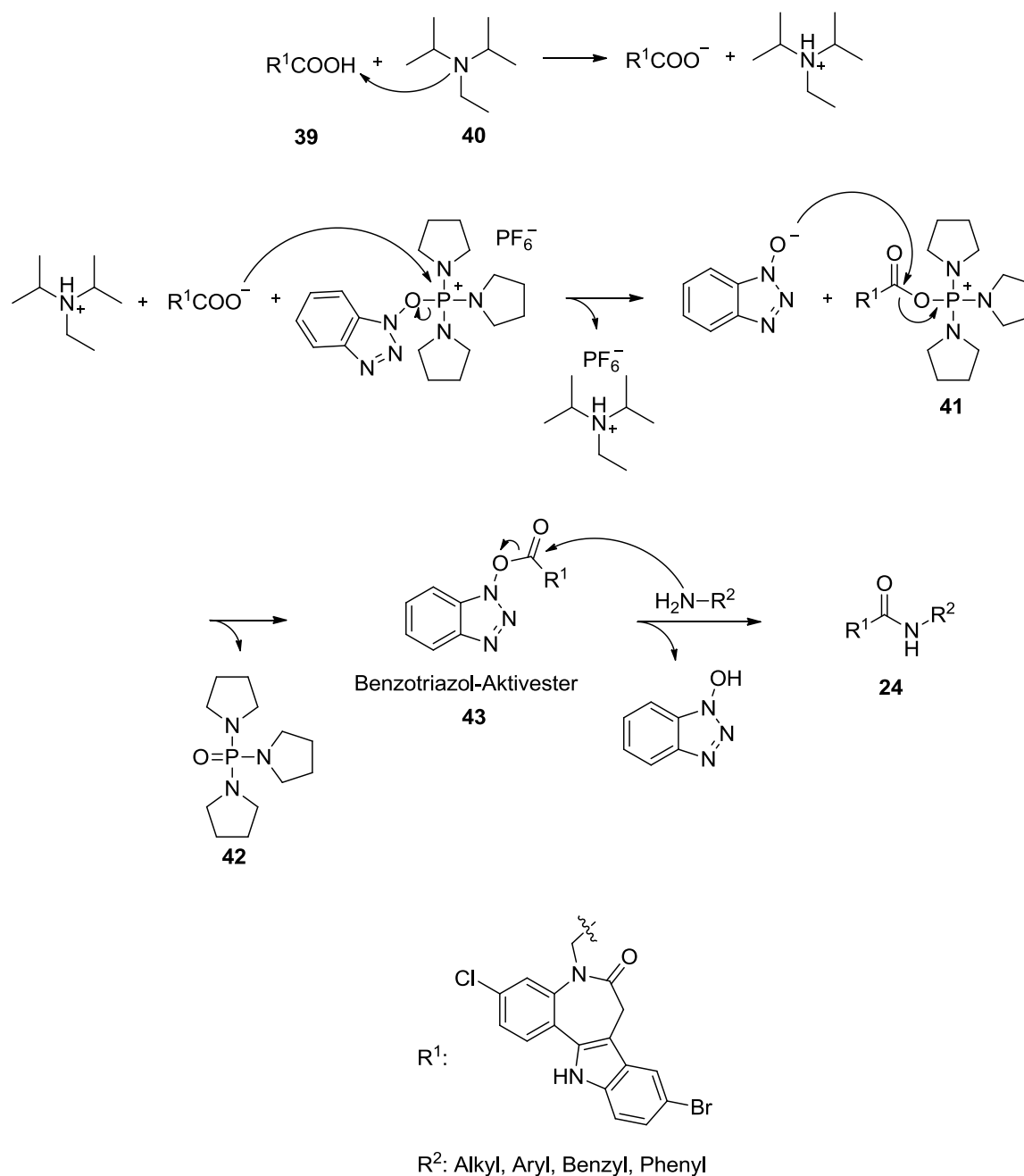
Reaktionsbedingungen: i) DMF, PyBOP, DIPEA, Anilin, 0 °C → RT, 20 h.

Tabelle 6: Synthetisierte Paullon-*N*⁵-acetamide.

24	R	24	R
a		g	
b		h	
c		k	
d		l	
e		m	
f			

Während der Bildung einer Amidbindung wird formal ein Wassermolekül aus der Carboxyl- und der Aminfunktion abgespalten. Da die Carboxylgruppe selbst nicht sehr reaktiv ist, wäre für eine direkte Reaktionsdurchführung eine hohe Energiezufuhr notwendig, was gegebenenfalls zu unerwünschten Nebenreaktionen führen könnte. Um die Carboxylgruppe der Verbindung **39** *in situ* in eine Gruppe höherer Reaktivität umzuwandeln, wurden das Kupplungsreagenz PyBOP und die Base DIPEA zu den Reaktionsansätzen hinzugegeben. In Anwesenheit von DIPEA (**40**) wird die Carboxylgruppe der Verbindung **39** wie in Schema 12 dargestellt über das

Intermediat **41** unter Abspaltung von Tri(pyrrolidin-1-yl)phosphinoxid (**42**) in einen Benzotriazol-Aktivester **43** überführt. Diese aktivierte Form **43** reagiert anschließend mit den entsprechenden Aminen zu den Paullon-*N*⁵-acetamidderivaten **24a-h** und **24i**⁹⁷.



Schema 12: *In situ* Carbonsäureaktivierung zum Benzotriazol-Aktivester unter Zugabe von PyBOP und DIPEA⁹⁷.

Chemical reaction scheme showing the conversion of compound **24h** to compound **24k** via step i).

Compound **24h** is a complex molecule featuring a central bicyclic core (indole-fused benzene) substituted with a chlorine atom and a bromine atom. It features a Boc-protected piperazine ring and a carbamate group.

The reaction is labeled **i)** and leads to compound **24k**, which is identical to **24h** but with the Boc group removed, replaced by a piperazine ring and a hydrochloride salt (HCl).

Reaktionsbedingungen: i) 1. TFA, CH_2Cl_2 , RT, 23 h, 2. Propan-2-ol, HCl.

- 49 -

$m/z = 490$ konnte ein für die Paullon- N^5 -acetamide aus dieser Arbeit charakteristisches Zerfallsprodukt bei $m/z = 402$ detektiert werden.

Zur Beschreibung der im Falle der Acetamidderivate **24** möglicherweise im Rahmen massenspektrometrischer Untersuchungen aufgetretenen Fragmentierungsreaktionen wird im Folgenden davon ausgegangen, dass zumindest im Moment des Eintritts der Fragmentierungsreaktion die Ladung bei allen hergestellten Acetamidderivaten am Amidstickstoff lokalisiert ist. In Abbildung 26 ist eine Fragmentierung am Beispiel von Verbindung **24b** dargestellt. Ausgehend vom Molekülion findet eine α -Spaltung an der Amidfunktion statt, wobei sich die positive Ladung am Sauerstoff lokalisiert und ein Aminradikal abgespalten wird. Das Fragment mit $m/z = 402$ wurde bei allen Verbindungen **24** detektiert.

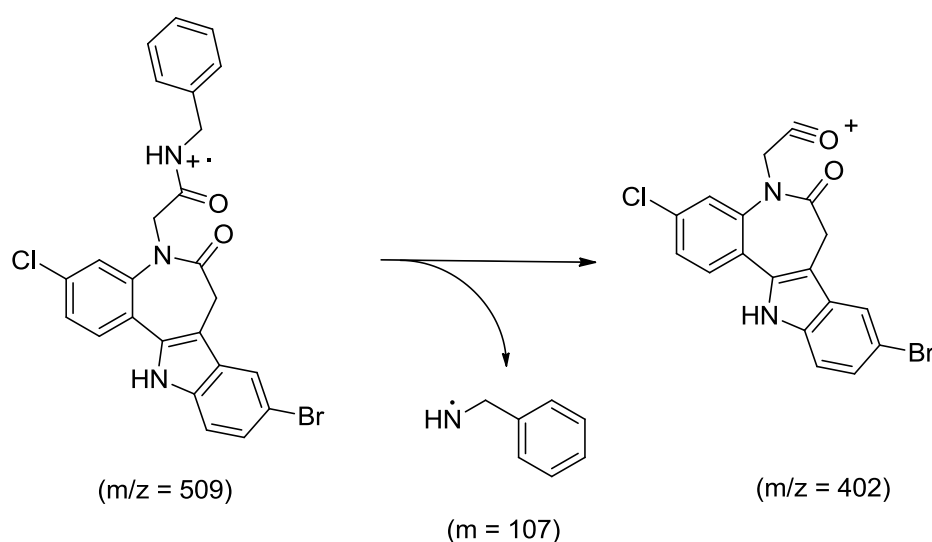


Abbildung 26: Postulierte Zerfallssequenz von Verbindung **24b** als Folge der Elektronenstoßionisation.

In den ^1H -NMR-Spektren der Acetamidderivate liegt wie bei den N^5 -Essigsäureesterderivaten eine Anisochronie der Azepinmethylenprotonen vor (in Abbildung 27 und Abbildung 28 grün hervorgehoben). Der Grund dafür ist auch hier wieder die eingeschränkte intramolekulare Dynamik, wodurch der am Siebenring stattfindende Konformationswechsel verlangsamt abläuft und somit die Methylenprotonen chemisch inäquivalent werden. Dadurch spaltet sich das in ^1H -Spektren von

N^5 -unsubstituierten Paullonen zu findende Singulett der Azepinmethylen­gruppe auf. Auch das Protonensignal der N^5 -CH₂-Gruppe spaltet bei N^5 -Substituenten mit großem sterischen Anspruch auf. Je größer und sperriger der Rest, umso eingeschränkter ist die Rotationsmöglichkeit der N^5 -Methylengruppe (in Abbildung 27 und Abbildung 28 rot hervorgehoben), wodurch die Isochronie der diastereotopen Protonen aufgehoben wird. Das zu erwartende Kopplungsmuster entspräche zwei Dubletts. In ¹H-NMR-Spektren der Acetamidderivate sind aber lediglich breite Signale mit unterschiedlich starker Aufspaltung zu sehen. Beispielhaft dargestellt sind die Spektren der Verbindungen **24a** und **24k**, welche unterschiedlich starke Aufspaltungen der N^5 -Methylensignale aufweisen. Während der N^5 -CH₂-Peak im Spektrum des Acetamids **24a** (siehe Abbildung 27) zwei sich stark überlappende breite Singulets darstellt, liegen im Spektrum des Acetamids **24k** (siehe Abbildung 28) zwei beinahe bis zur Grundlinie getrennte breite Singulets vor. Die Aufspaltungen in Dubletts sind auch hier wieder auf Grund einer Messung nahe der Koaleszenztemperatur nicht zu sehen.

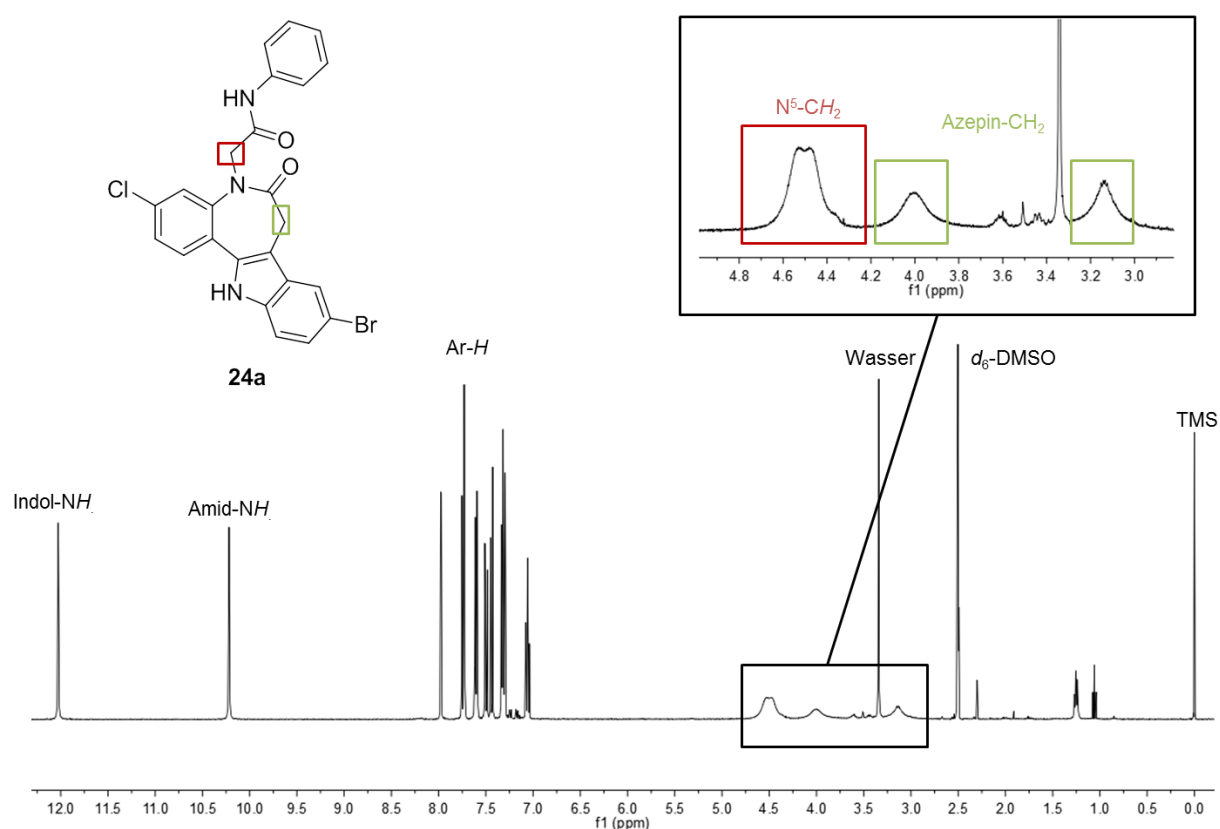


Abbildung 27: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **24a**.

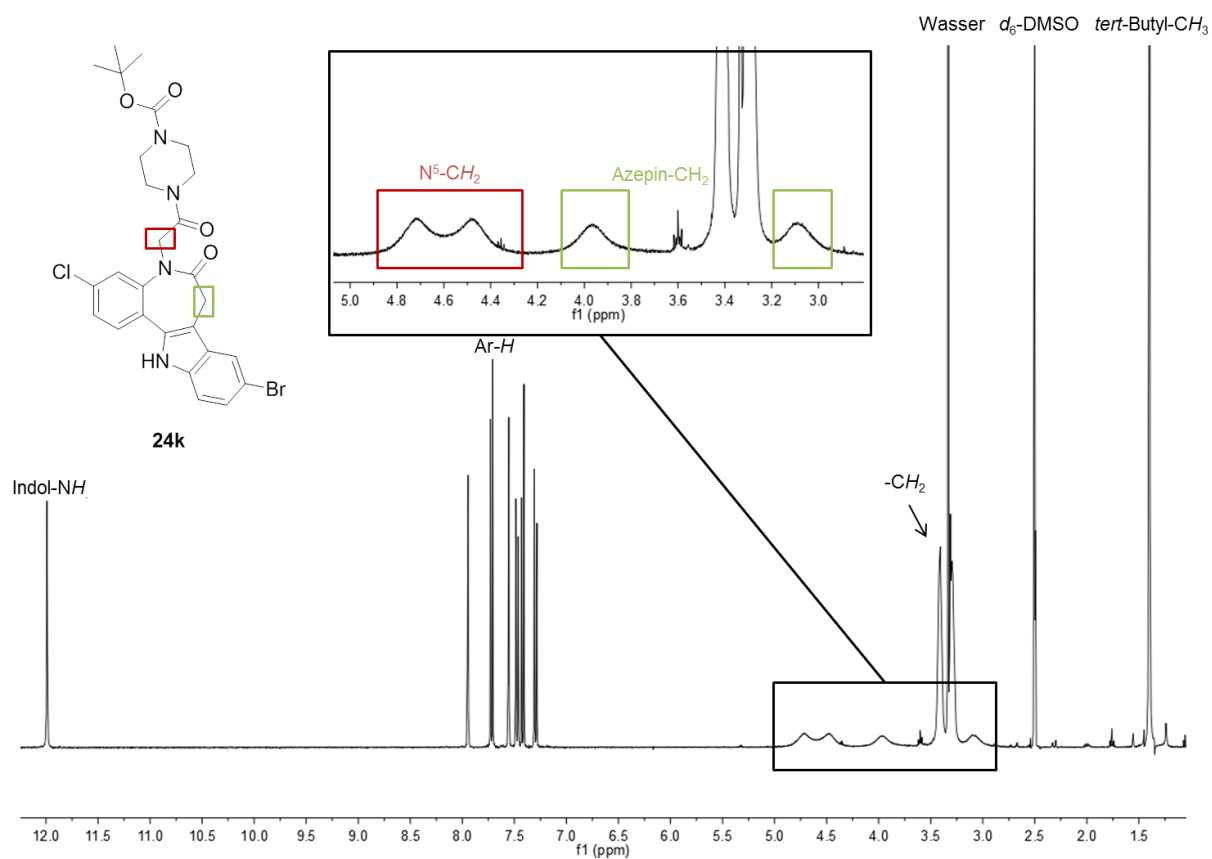
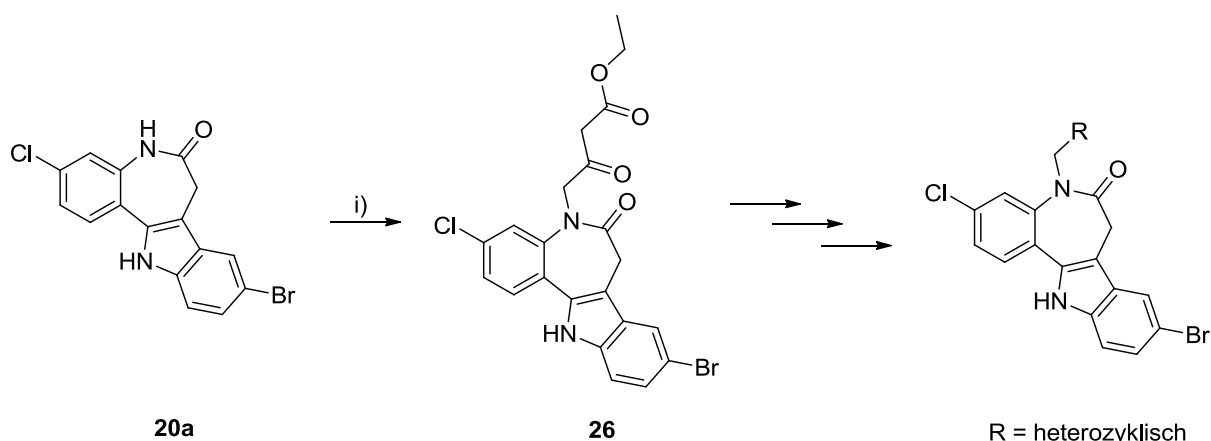


Abbildung 28: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **24k**.

Das Ziel weiterer Synthesen war die Anbringung eines zyklischen, über eine Methylengruppe gebundenen Substituenten an die N^6 -Position des 9-Brom-3-chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-ons (**20a**). Die ursprüngliche Idee für die Strategie zur Anknüpfung zyklischer Strukturen an das 3-Chlor-Kenpaullon (**20a**) bestand darin, zunächst Verbindung **26** zu synthetisieren (siehe Schema 14) und daraus in Reaktionen mit Hydrazin, Guanidin bzw. Harnstoff die zyklischen Verbindungen **25**, **44** und **45** herzustellen (siehe Abbildung 29).



Schema 14: Geplante Synthese von Ethyl-4-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-dihydrobenzo-[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-3-oxobutanoat (**26**) in Analogie zu CHUNG et al.⁹⁸ mit anschließender Derivatisierung des N^6 -Restes zu heterozyklischen Strukturen
Reaktionsbedingungen: i) γ -Bromacetessigsäureethylester, KOH, $(\text{Bu})_4\text{NBr}$, Toluol, 70 °C.

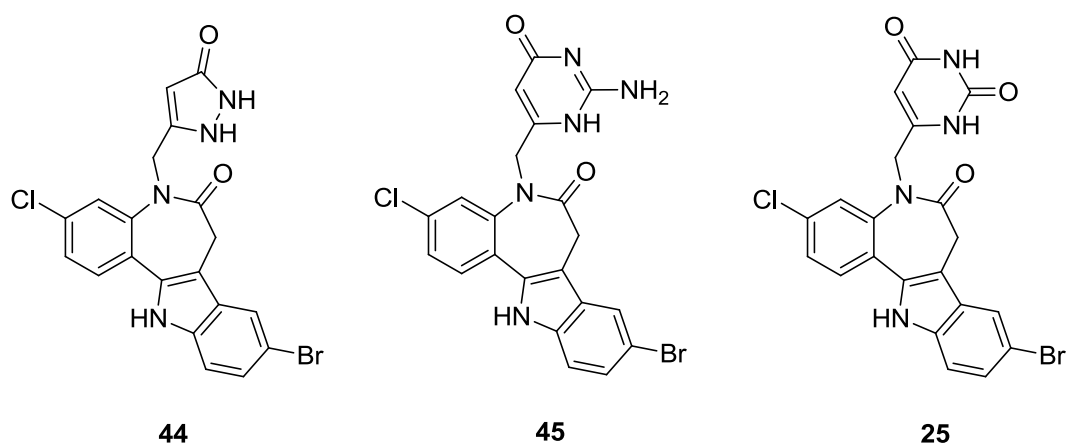
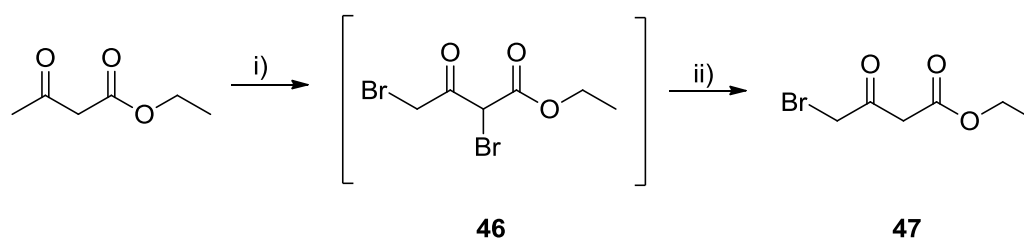


Abbildung 29: Geplante Verbindungen mit über eine Methylengruppe an die N^6 -Position gebundenen Heterozyklen.

Die zur Herstellung der Substanz **26** notwendige Anknüpfung von γ -Bromacetessigsäureethylester an die Position 5 des Paullons **20a** unter basischen Bedingungen war jedoch in keiner der im Folgenden beschriebenen Reaktionsansätze erfolgreich.

KIM et al.⁹⁹ publizierte einen Syntheseweg für die Alkylierung von Pyridazin-6-onen in N^1 -Position unter Zugabe des Phasentransferkatalysators Tetrabutylammoniumbromid. CHUNG et al.⁹⁸ verwendeten denselben Syntheseweg für die Herstellung von 4-(4,5-Dichlor-6-oxopyridazin-1-yl)-3-oxobutanoat aus 4,5-Dichlorpyridazin-3(2*H*)-on und berichteten von einer 81%igen Ausbeute. Auf Grundlage dieser Publikationen wurde auch die in Schema 14 beschriebene Synthese durchgeführt. Dafür wurde zunächst nach einer Vorschrift von CHOI et al.¹⁰⁰ γ -Bromacetessigsäureethylester (**47**) hergestellt (Schema 15).



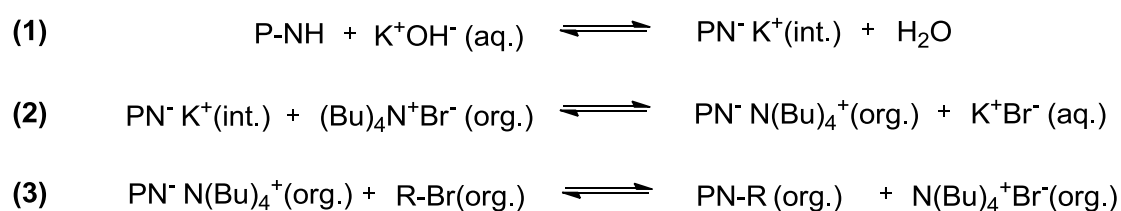
Schema 15: Synthese von γ -Bromacetessigsäureethylester (**47**) nach CHOI et al.¹⁰⁰

Reaktionsbedingungen: i) Eisessig, HBr, Br₂, 6 h, RT; ii) Aceton, RT, 12 h.

Mit Hilfe der Methode von CHOI et al.¹⁰⁰ kann selektiv das thermodynamisch kontrollierte Produkt unter Bromierung der weniger aktivierten terminalen Position gewonnen werden. Die Entstehung des kinetisch kontrollierten Produktes, bei welchem der Bromsubstituent zwischen den Carbonylgruppen platziert ist, wird vermieden. Dies wird durch die Strategie der nichtselektiven Dibromierung mit anschließender selektiver Debromierung erreicht. Im ersten Schritt findet eine 1,3-Dibromierung durch Zugabe eines Überschusses an Brom in Anwesenheit von Bromwasserstoff statt, wodurch das in Schema 15 dargestellte Zwischenprodukt **46** entsteht. Durch Zugabe von Aceton als Abfangreagenz findet an dem nicht isolierten dibromierten Zwischenprodukt im zweiten Reaktionsschritt eine selektive irreversible Debromierung an der internen Position statt¹⁰⁰. Verbindung **47** konnte auf diesem

Weg mit einer Ausbeute von 57% hergestellt werden. Da das synthetisierte Produkt **47** sehr instabil ist, wurde es bei 8 °C unter Schutzgasatmosphäre gelagert.

Anschließend wurde Verbindung **47** (R-Br in Schema 16) mit dem 3-Chlor-Kenpaullon **20a** (P-NH) nach der Vorschrift von CHUNG et al.⁹⁸ umgesetzt (siehe Schema 14, Schema 16). Für die Durchführung der Fest/Flüssig-Phasentransferkatalyse (PTC) wurden gemäß der Vorschrift zum Edukt Tetrabutylammoniumbromid ((Bu)₄NBr) als Phasentransferkatalysator und Kaliumhydroxid (KOH) als Base zugesetzt, als Lösungsmittel wurde wässriges Toluol verwendet.



Schema 16: Postulierter PTC-Verlauf nach MAKOSZA¹⁰¹

P-NH: 3-Chlor-Kenpaullon **20a**; R-Br: **47**; int. = an der Phasengrenze.

Der Verlauf einer PTC mit organischem Anion nach MAKOSZA¹⁰¹ ist in Schema 16 dargestellt. Das nach der ersten Gleichung hergestellte nukleophile Anion, also das deprotonierte Ausgangspaulon **20a**, reagiert im zweiten Schritt mit dem in der organischen Phase gelösten Tetrabutylammoniumbromid. In der Form des quartären Ammoniumsalzes soll die Löslichkeit des Paullons durch die Lipophilie der übertragenen Reste im organischen Lösungsmittel erhöht werden. Dort sollte es dann mit dem eingesetzten Elektrophil, γ -Bromacetessigsäureethylester (**47**), unter Freisetzung des katalytisch eingesetzten Tetrabutylammoniumbromids zum gewünschten Produkt Ethyl-4-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]-azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-3-oxobutanoat (**26**) reagieren. Unter diesen Reaktionsbedingungen konnte das gewünschte Produkt **26** nicht gewonnen werden. Stattdessen wurde nach Aufarbeitung des Reaktionsgemisches lediglich das Edukt **20a** isoliert. Möglicherweise stellt die extrem schlechte Löslichkeit der Verbindung **20a** in organischen Lösungsmitteln ein Problem dar, sodass bereits die Deprotonierung nicht erfolgen konnte. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die CH-acide CH₂-Gruppe des γ -Bromacetessigsäureethylesters (**47**) deprotoniert wird, da diese im

organischen Lösungsmittel gelöst vorliegt und an der Phasengrenze mit der eingesetzten Base reagieren könnte.

Als alternative Methode wurden die schon zuvor bei N^5 -Substitutionen erprobten Reaktionsbedingungen nach SCHULTZ⁸⁹, BECKER⁹⁰ und STUHLMANN et al.⁷⁷ eingesetzt. Die Reaktionen mit dem Edukt **20a** wurden in Tetrahydrofuran unter Zugabe von äquimolaren Mengen der Basen Natriumhydrid (NaH) bzw. Kalium-*tert*-butylat (KO^tBu) durchgeführt, bis dünnschichtchromatographisch kein Edukt **20a** mehr nachgewiesen werden konnte. Die Reaktionstemperatur wurde, wie in Tabelle 7 dargestellt, variiert.

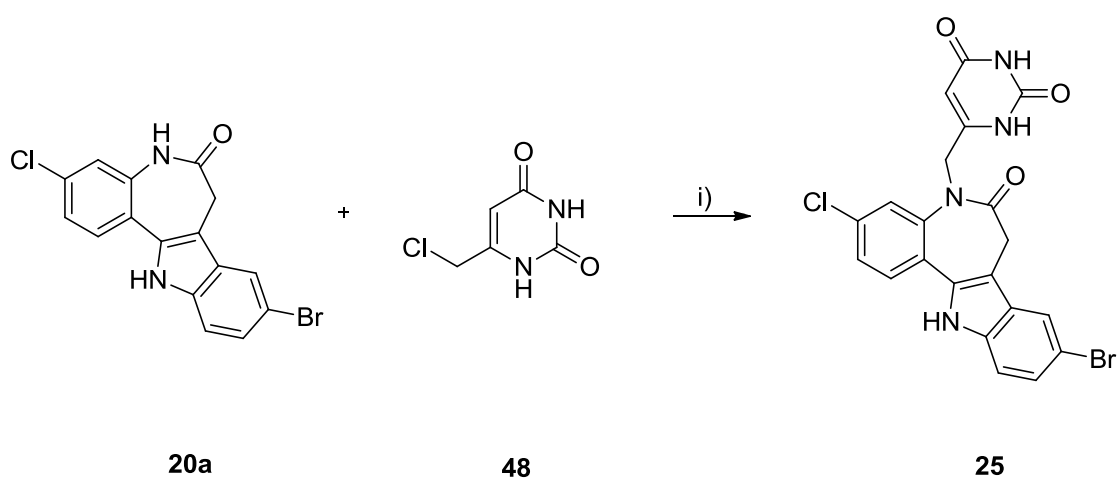
Tabelle 7: Variation der Reaktionsbedingungen bei den Versuchen zur Synthese von Ethyl-4-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-3-oxobutanoat (**26**) nach SCHULTZ⁸⁹, BECKER⁹⁰ und STUHLMANN et al.⁷⁷.

Menge 20a	Menge Base	Reaktions- temperatur	Reaktions- dauer	Ausbeute in %
1.0 mmol	1.1 mmol KO ^t Bu	RT	24 h	0
1.0 mmol	1.0 mmol KO ^t Bu	80 °C	23 h	0
1.0 mmol	1.1 mmol NaH	RT	24 h	0
1.0 mmol	1.1 mmol NaH	80 °C	5 h	0

Wie aus Tabelle 7 zu entnehmen ist, lieferte auch diese Methode nicht das gewünschte Produkt **26**. Das Edukt **20a** löste sich im Lösungsmittel Tetrahydrofuran unter Zugabe von Natriumhydrid bzw. Kalium-*tert*-butylat, sodass der Grund für das Scheitern der Synthese in diesem Fall nicht der Löslichkeit des Eduktes zugeschrieben werden kann. Allerdings gibt es auch hier die Möglichkeit der Deprotonierung der CH-aciden Methylengruppe des γ -Bromacetessigsäureethyl-esters (**47**). Diese potentielle Nebenreaktion und die geringe Stabilität der Verbindung **47** sind vermutlich an der Hinderung der Produktbildung beteiligt.

Die Isolierung von **26** war bei keinem der durchgeführten Versuche möglich, sodass keine weiteren Derivatisierungen ausgehend von dieser Verbindung folgen konnten. Da somit die zentrale Zwischenstufe **26** der im Schema 14 skizzierten Synthesesequenz nicht vorlag, waren auch die angestrebten Verbindungen **25**, **44** und **45** auf diesem Weg nicht zugänglich.

Als alternative Synthesemethode für die gewünschten Produkte **25**, **44** und **45** wurde analog zu YANO et al.¹⁰² und CHAFEEV et al.¹⁰³ die direkte *N*⁶-Substitution der Ausgangsverbindung **20a** mit chlormethylierten Heterozyklen angestrebt (siehe Schema 17).

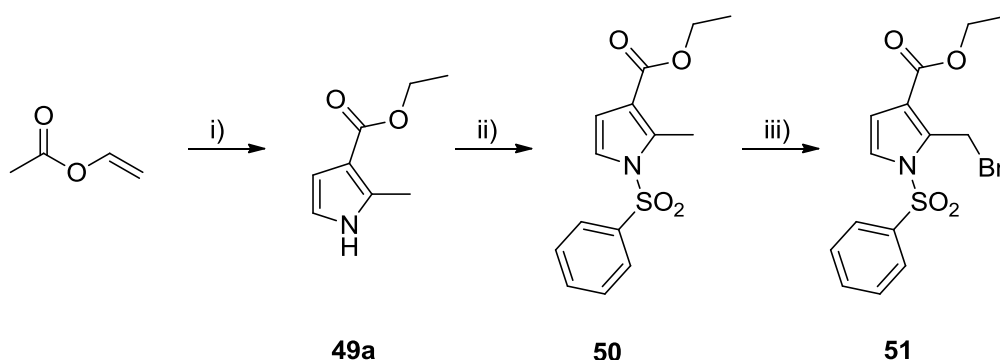


Schema 17: Versuch zur Synthese von 6-[(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo-[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)methyl]pyrimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**25**)

Reaktionsbedingungen: i) THF, KO^tBu, RT.

Bei der Reaktionsdurchführung gemäß Schema 17 konnte das gewünschte Produkt **25** nicht hergestellt werden. Wahrscheinlich wurde das eingesetzte 6-Chlor-methyluracil an den Stickstoffatomen deprotoniert, was Anlass zu Nebenreaktionen gewesen sein könnte. Analoge Synthesesequenzen zu den Verbindungen **44** und **45** wurden auf Grund ähnlicher Problemstellungen wie bei der Synthese von Verbindung **25** nicht ausgeführt. Die Reagenzien für die Herstellung von **44** und **45** beinhalten jeweils mehrere deprotonierbare Zentren, weshalb auch in diesen Fällen mit zahlreichen Nebenreaktionen zu rechnen war.

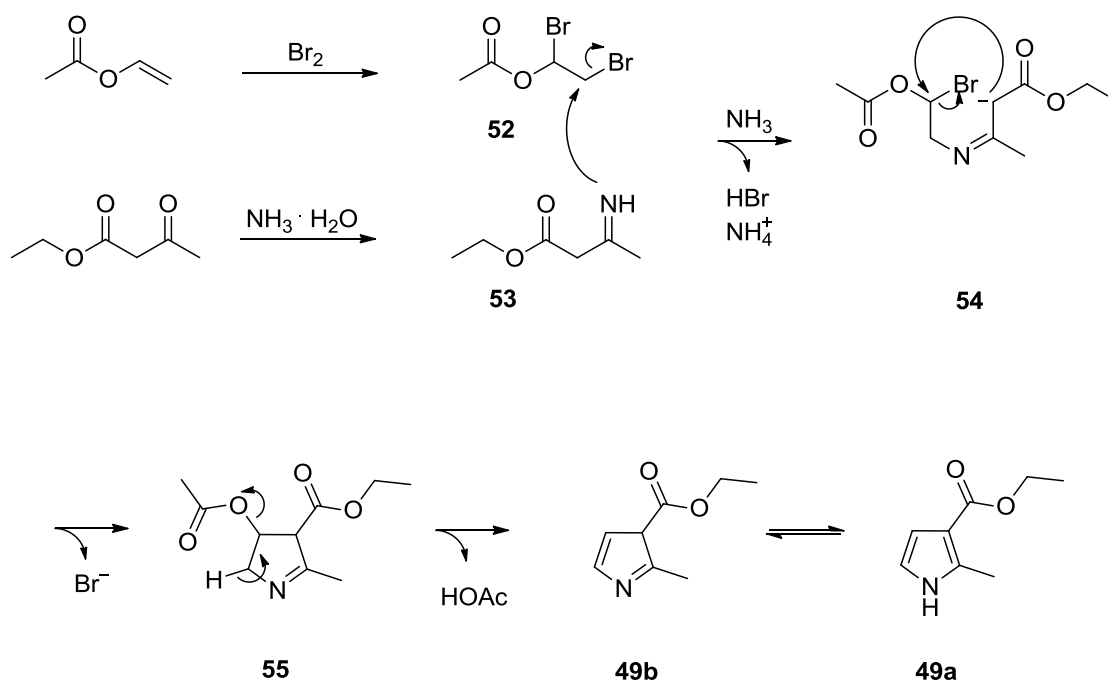
Durch die Einführung von Schutzgruppen sollte die unkontrollierte Deprotonierung ungewünschter Positionen vermieden werden. Die Phenylsulfonylschutzgruppe wurde in dieser Arbeit für die Schützung von Stickstoffatomen ausgewählt, weil sie unter den eingesetzten Reaktionsbedingungen stabil ist, aber unter vergleichsmäßig milden Bedingungen abgespalten werden kann. Die Schutzgruppeneinführung im Falle der in Abbildung 29 aufgeführten Zyklen könnte aber zu großen sterischen Einschränkungen bei der Substitution an die N^5 -Position des Paullons **20a** führen. Jeder der Zyklen müsste an zwei Positionen geschützt werden, wodurch der räumliche Anspruch stark ansteigen würde. Deshalb konzentrierte sich die Synthese neuer zyklischer Verbindungen im Folgenden auf solche mit lediglich einer zu schützenden Position, wie es beispielsweise bei Pyrrolen der Fall ist. In einer dreistufigen Synthese nach JOHNSON et al.¹⁰⁴ und WEE et al.¹⁰⁵ wurde Ethyl-2-(brommethyl)-1-(phenylsulfonyl)-1*H*-pyrrol-3-carboxylat (**51**) hergestellt (siehe Schema 18). Im ersten Reaktionsschritt wird das Pyrrolgrundgerüst gebildet, im zweiten ein Phenylsulfonylrest als Schutzgruppe eingeführt, woraufhin der Pyrrolstickstoff bei der anschließenden Bromierung der Seitenkette und der Substitutionsreaktion an den N^5 -Stickstoff des Paullons **20a** nicht tangiert wird.



Schema 18: Synthesesequenz zu Ethyl-2-(brommethyl)-1-(phenylsulfonyl)-1*H*-pyrrol-3-carboxylat (**51**)

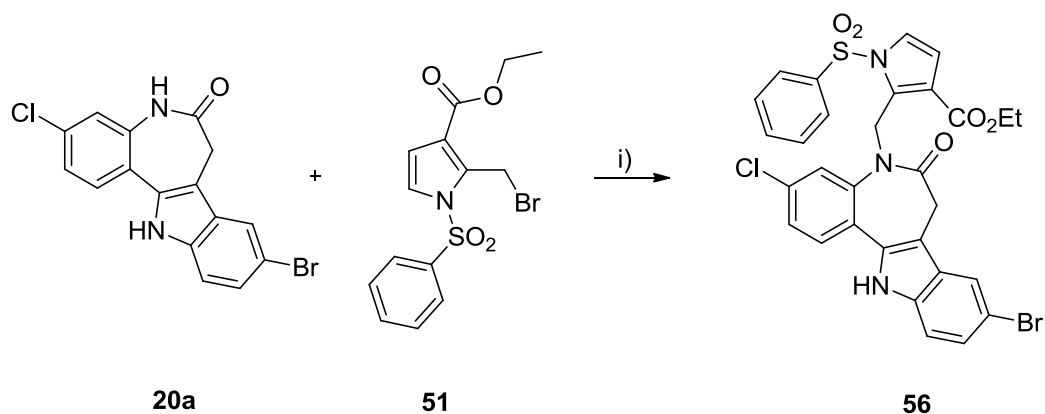
Reaktionsbedingungen: i) 1. CCl_4 , Br_2 , 2. Acetessigsäureethylester, 10%ige NH_4OH ;
 ii) Toluol, NaOH , $(\text{Bu})_4\text{NBr}$, Phenylsulfonylchlorid; iii) CCl_4 , NBS, BPO.

In dem für die erste Stufe der Pyrrolsynthese in Schema 19 postulierten Mechanismus greift das hergestellte Imin **53** im Zuge einer nukleophilen Substitution an dem mittels Brom dibromierten Vinylacetat **52** unter Freisetzung eines Bromidions an. Die deprotonierte CH-acide α -Position des Esters **54** reagiert unter intramolekularem Ringschluss und erneuter Abspaltung eines Bromidions zu **55** weiter. Die finale Eliminierung von Essigsäure liefert das zyklische Enamin-Imin-Tautomer **49a** bzw. **49b**.



Schema 19: Postulierter Mechanismus der Pyrroldarstellung.

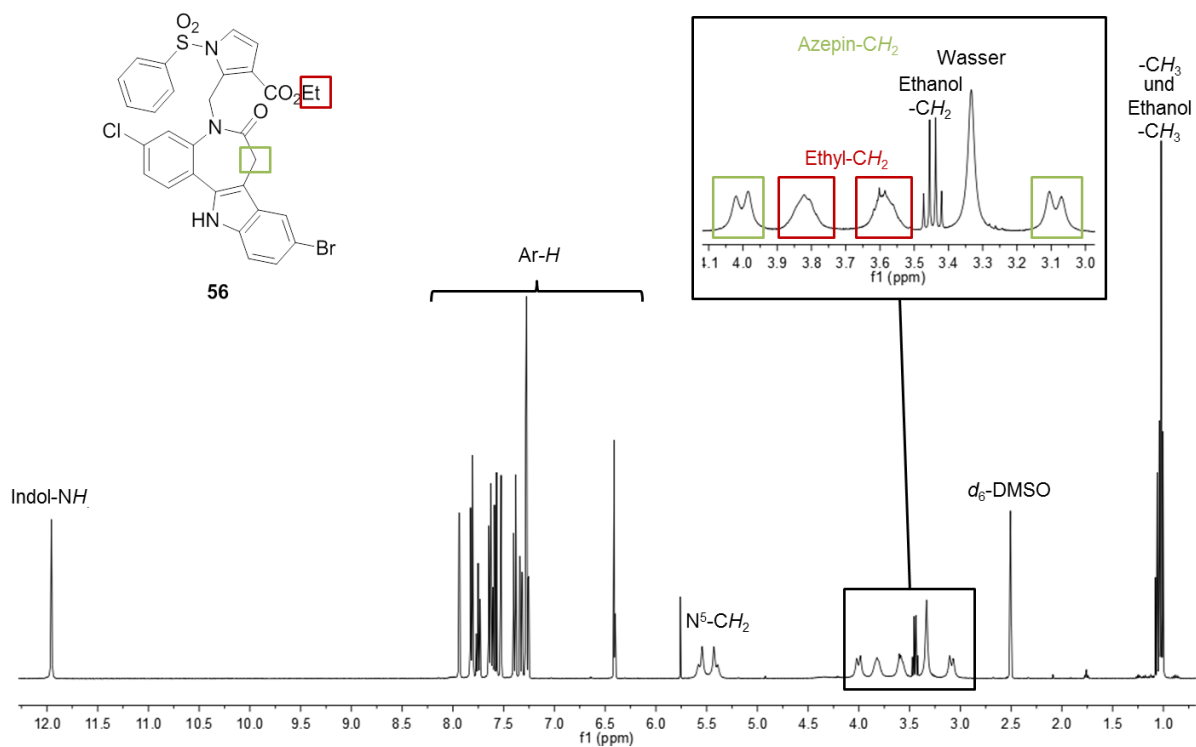
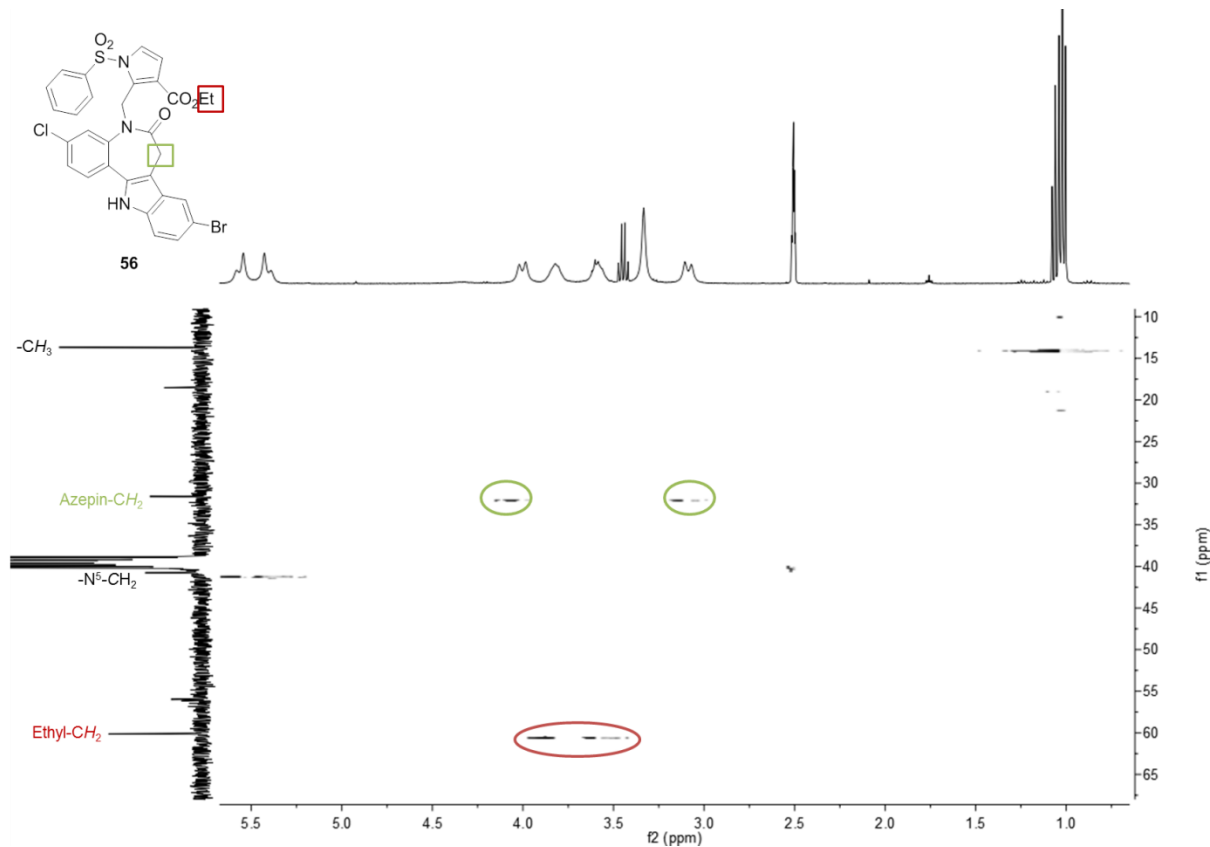
Die Umsetzung von Verbindung **51** mit 3-Chlor-9-brom-7,12-dihydroindolo-[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**20a**) in Tetrahydrofuran unter Zugabe von Kalium-*tert*-butylat lieferte das Produkt **56** (siehe Schema 20).



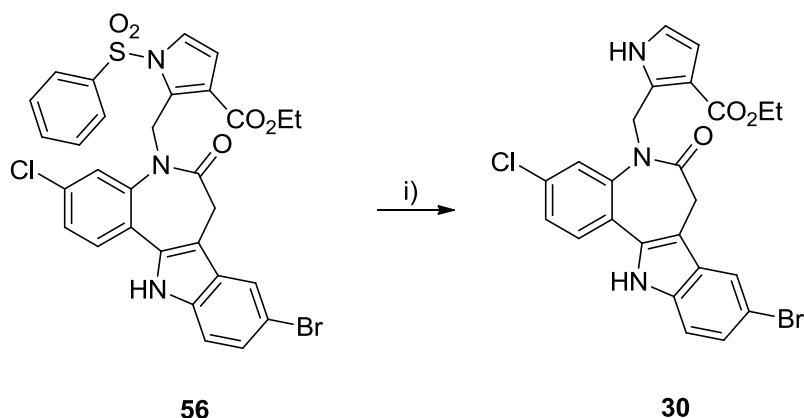
Schema 20: Synthese von Ethyl-2-[(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]-azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)methyl]-1-(phenylsulfonyl)-1*H*-pyrrol-3-carboxylat (**56**)

Reaktionsbedingungen: i) THF, KO^{*t*}Bu, RT.

Die Signale im ¹H-NMR-Spektrum entsprachen den Erwartungen. Die Kreuzpeaks im *H,C*-HSQC-Spektrum ermöglichten die Zuordnung der breiten Signale im ¹H-NMR-Spektrum zu den Azepin- bzw. Ethylesterprotonen (siehe Abbildung 30, Abbildung 31).


 Abbildung 30: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **56**.

 Abbildung 31: Ausschnitt aus dem H,C-HSQC-Spektrum der Verbindung **56**.

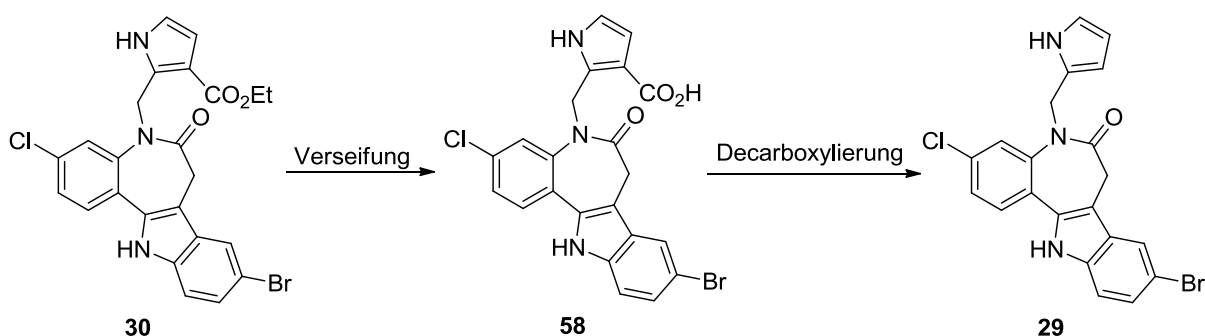
Die Abspaltung der Phenylsulfonylgruppe der Verbindung **56** erfolgte nach ANDERSON et al.¹⁰⁶ in Ethanol unter Zugabe von Kaliumhydroxid und ergab das ungeschützte Pyrrolderivat **30**.



Schema 21: Synthese von Ethyl-2-[(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo-[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)methyl]-1*H*-pyrrol-3-carboxylat (**30**)

Reaktionsbedingungen: i) 1. EtOH, KOH, RT, 2. H₂O.

Durch eine Verseifung des Ethylesters **30** zur Carbonsäure **58** und eine daran anschließende Decarboxylierung sollte 5-[(1*H*-Pyrrol-2-yl)methyl]-9-brom-3-chlor-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**29**) synthetisiert werden (siehe Schema 22).



Schema 22: Angestrebte Synthese von 5-[(1*H*-Pyrrol-2-yl)methyl]-9-brom-3-chlor-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**29**) durch Verseifung der Verbindung **30** und anschließender Decarboxylierung von **58**.

Ausgehend von Verbindung **30** wurden sowohl basisch als auch sauer katalysierte Verseifungsversuche durchgeführt. Tabelle 8 zeigt die Variationen der basischen Reaktionsbedingungen bezüglich Lösungsmittel, eingesetzter Äquivalente und Art der Base¹⁰⁷⁻¹⁰⁸. Variiert wurde zwischen den Basen Kaliumhydroxid, Lithiumhydroxid und Natriumhydroxid. Die Synthesen wurden zunächst in einem Wasser/THF-Gemisch (5:1) unter Rückfluss durchgeführt, wobei THF auf Grund der schlechten Wasserlöslichkeit des Paullons **30** zugesetzt wurde. Um höhere Reaktionstemperaturen zu erreichen, wurden weitere Versuche in Ethylenglykol unter Rückfluss durchgeführt. Die Reaktionsdauer betrug jeweils zwei Stunden.

Tabelle 8: Versuche zur basisch katalysierten Hydrolyse von Ethyl-2-[(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)methyl]-1*H*-pyrrol-3-carboxylat (**30**).

Reaktionsbedingungen: **30**, 2 h, Δ; Wasser/THF Gemisch = 5:1, entsprechende Base.

Art der Base	Äquivalente der Base	Lösungsmittel	Isolierte Substanz
NaOH, KOH oder LiOH	4	Wasser/THF	30
NaOH, KOH oder LiOH	8	Wasser/THF	30
NaOH, KOH oder LiOH	12	Wasser/THF	30
NaOH, KOH oder LiOH	16	Wasser/THF	30
NaOH, KOH oder LiOH	20	Wasser/THF	30
NaOH, KOH oder LiOH	20	Ethylenglykol	20a

Bei den Versuchen der basischen Verseifung von Verbindung **30** unter Zugabe von vier Äquivalenten Kaliumhydroxid, Lithiumhydroxid oder Natriumhydroxid in einem Wasser/THF-Gemisch konnte dünnschichtchromatographisch keine Umsetzung des eingesetzten Eduktes verzeichnet werden. Die Erhöhung der

Äquivalente der jeweils eingesetzten Base erbrachte auch keinen Reaktionserfolg. Aus allen Ansätzen konnte lediglich Edukt **30** wiedergewonnen werden.

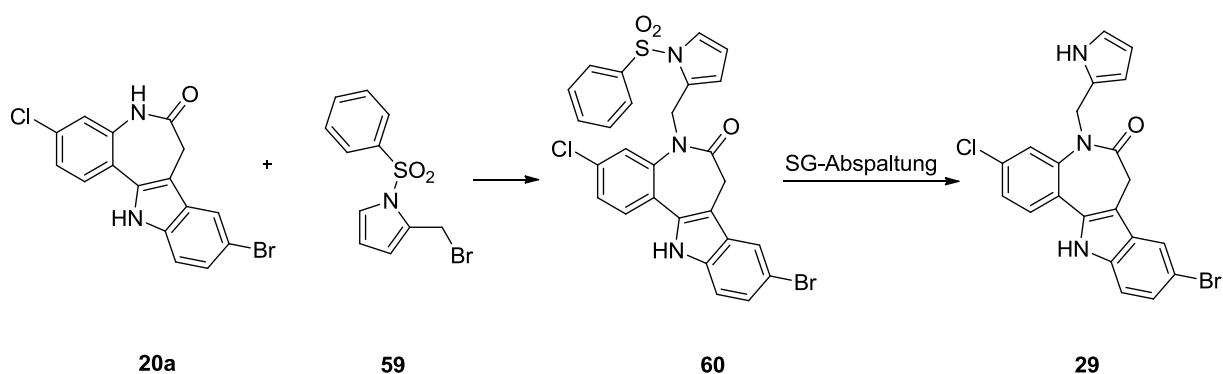
Die in Ethylenglykol unter Rückfluss durchgeführten Synthesen, bei denen jeweils 20 Äquivalente der entsprechenden Base zugegeben wurden, zeigten einen neuen Fleck auf dem Dünnschichtchromatogramm. Diese Verbindung konnte isoliert und anhand von NMR-Spektren als 9-Brom-3-chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]-benzazepin-6(5*H*)-on (**20a**) identifiziert werden, welches durch Abspaltung des *N*⁵-Substituenten vom Paullonggrundkörper entstanden war. Das gewünschte Verseifungsprodukt **58** konnte unter den in Tabelle 8 beschriebenen basischen Bedingungen nicht erhalten werden.

Des Weiteren wurden Reaktionen unter sauren Bedingungen nach NESTEROV et al.¹⁰⁹ durchgeführt. Hierzu wurden Verbindung **56** und Verbindung **30** jeweils in Dioxan gelöst und nach Zugabe von konzentrierter Salzsäure eine Stunde bei 85 °C gerührt. Dünnschichtchromatographisch war anschließend jeweils ein neuer Fleck zu detektieren. Auch hier konnte nach der Isolierung der entstandenen Produkte lediglich das Zersetzungsprodukt 9-Brom-3-chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**20a**) nachgewiesen werden.

Um die Zielverbindung **29** zu synthetisieren, wurden Versuche zur Dealkoxy- bzw. Decarbonylierung von **56** und **30** unter neutralen Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurden die Edukte jeweils in einem DMSO/Wasser-Gemisch mit dem Verhältnis 9:1 für sechs Stunden bei 150 °C gerührt⁸³. Das geschützte Derivat **56** wurde unter den angewandten Reaktionsbedingungen nicht umgesetzt, es konnte aus der Reaktionslösung wiedergewonnen werden. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der Reaktion mit Verbindung **30** zeigten erneut das Zersetzungsprodukt **20a**, welches auch kernresonanzspektroskopisch nachgewiesen wurde.

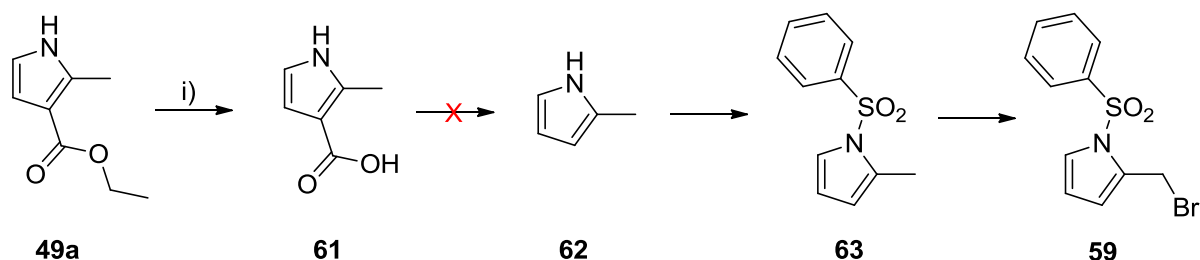
Die Verbindungen **56** bzw. **30** konnten weder durch basische noch durch saure Bedingungen zum Zwischenprodukt **58** verseift werden. Auch unter neutralen Bedingungen durchgeführte Dealkoxy- bzw. Decarbonylierungsversuche beider Eduktverbindungen **56** und **30** scheiterten. Möglicherweise ist das an die *N*⁵-Position substituierte Pyrrol durch das Paullonggrundgerüst sterisch stark abgeschirmt, sodass keine Verseifung oder Dealkoxycarbonylierung stattfinden kann.

Da sich die Pyrrolmethylopaullone **56** und **30** nicht zu den Verseifungs- oder Dealkoxycarbonylierungsprodukten umsetzen ließen, konzentrierten sich anschließende Versuche auf das Pyrrol selbst. Es sollte zunächst Verbindung **59** hergestellt werden, um anschließend in einer nukleophilen Substitution an die 5-Position des 3-Chlor-Kenpaullons (**20a**) angeknüpft zu werden (siehe Schema 23).



Schema 23: Geplante Syntheseroute zur Herstellung der Verbindung **29**.

Für die Synthese von Verbindung **59** sollte Verbindung **49a** nach Schema 24 im ersten Schritt verseift und anschließend decarboxyliert werden. Die NH-Gruppe des 2-Methylpyrrols (**62**) sollte mit Hilfe einer Phenylsulfonylgruppe geschützt werden, um daran anschließend die Bromierung der Methylgruppe zu Verbindung **59** durchzuführen.



Schema 24: Geplante Synthesesequenz zur Herstellung von 2-(Brommethyl)-1-(phenylsulfonyl)-1H-pyrrol (**59**)

Reaktionsbedingungen: i) KOH, H₂O, 100 °C.

Für die Synthese der 2-Methyl-1*H*-pyrrol-3-carbonsäure (**61**) wurde Verbindung **49a** in Wasser unter Zugabe von Kaliumhydroxid bei 100 °C zum gewünschten Produkt verseift¹⁰⁸. Die darauf folgenden thermischen Decarboxylierungsversuche^{108, 110} zum 2-Methylpyrrol (**62**) in Ethylenglykol, Ethanolamin oder in Substanz lieferten nicht das gewünschte Produkt. Dünnschichtchromatographisch ließ sich meist eine Umsetzung des Eduktes ermitteln. Problematisch war die Isolierung des entstandenen Stoffes aus der Reaktionsmischung. Da Pyrrole relativ instabil sind¹¹⁰, wurden Vakuumdestillationen bzw. Wasserdampfdestillationen zur schonenden Abtrennung des flüssigen Produktes vom Reaktionsansatz angewandt¹¹¹. Das Produkt **62** konnte jedoch nicht isoliert werden.

Aus einer Dealkoxycarbonylierungsreaktion der Verbindung **49a** nach STUHLMANN et al.⁷⁷ in wässrigem Dimethylsulfoxid bei 150 °C konnte ebenfalls kein Produkt **62** isoliert werden. Auf Grund von dünnschichtchromatographischen Untersuchungen liegt die Vermutung nahe, dass die geringe Stabilität des Produktes **62** eine Isolierung verhinderte. Die in Schema 23 und Schema 24 skizzierten Synthesesequenzen konnten daher nicht weiter verfolgt werden.

4 Biologische Evaluierung

Die biologischen Untersuchungen an *T. b. brucei* und den Trypanothion-synthetasen sowie die Expression dieser Enzyme in *E. coli* wurden von Herrn D. Benítez, Herrn D. Charquero und Herrn M. A. Comini aus der Gruppe *Redox Biology of Trypanosomes* des Instituts Pasteur de Montevideo in Uruguay durchgeführt. Sofern nicht anders erwähnt, wurden die verwendeten Reagenzien in analytischer Qualität eingesetzt und von Sigma-Aldrich erworben. Die Zytotoxizitätsmessungen an Mausmakrophagen und die Messungen an *T. cruzi* wurden von Frau M. Abad Dar, Frau H. Erdmann und Herrn C. Hölscher aus der Forschungsgruppe Infektionsimmunologie des Forschungszentrums in Borstel übernommen.

4.1 Vitalitäts- und Proliferationsuntersuchungen

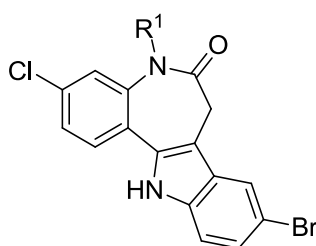
4.1.1 MTT-Assay an *T. cruzi*-Epimastigoten

Der Einfluss der synthetisierten Verbindungen auf die Vitalität und Proliferation von *T. cruzi*-Epimastigoten des Y-Stamms wurde mit Hilfe eines MTT Assays bestimmt. Durch die Zuhilfenahme von MTT wird ein mit Fehlern behaftetes, zeitaufwändiges mikroskopisches Auszählen der Trypanosomen überflüssig. Die angewandte MTT-Methode basiert auf der Fähigkeit lebender Zellen, das wasserlösliche gelbe MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zu wasserunlöslichem blauen Formazan zu reduzieren. Die Menge des produzierten Formazans kann in gelöster Form photometrisch erfasst werden. Sie ist proportional zur metabolischen Aktivität und der Menge der Zellen im Test und lässt Aussagen über die Überlebensfähigkeit der verwendeten Zellkulturen zu ¹¹²⁻¹¹⁴.

Kontrollen wurden unter Zugabe von Nifurtimox (11 μM), 0.1% DMSO und in 100% LIT-Medium durchgeführt.

Die Ergebnisse der Proliferationsuntersuchungen der Verbindungen, die eine antiproliferative Aktivität gegenüber *T. cruzi* Epimastigoten zeigten, sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Antiproliferative Aktivität der Verbindungen **23a-c**, **30** und **56** an *T. cruzi*-Epimastigoten; ermittelt mit Hilfe der photometrischen MTT-Methode.



Verb.	R ¹	IC ₅₀ [μM]	Verb.	R ¹	IC ₅₀ [μM]
23a		35	56		26
23b		29	30		28
23c		25			

Zu sehen ist, dass die Paullon-*N*⁵-essigsäureester **23a-c** und die Pyrrolderivate **30** und **56** *T. cruzi*-Epimastigoten mit IC₅₀-Werten im zweistellig mikromolaren Bereich inhibieren. Beim Vergleich der antiproliferativen Aktivitäten der Esterderivate **23a-c** untereinander fällt auf, dass die IC₅₀-Werte mit zunehmender Größe des Esterrestes (-Me bis -*tert*-Butyl) sinken. Dieser Trend könnte darin begründet sein,

dass ein sterisch anspruchsvollerer *tert*-Butylestersubstituent am Lactamstickstoff des Paullons **20a** möglicherweise die Bindetasche des adressierten Targets besser ausfüllt als ein kleinerer Methylestersubstituent. Die Betrachtung der Ergebnisse der Pyrrolderivate **30** und **56** lässt die Vermutung zu, dass der Phenylsulfonylrest am Pyrrolstickstoff der Verbindung **56** keinen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität hat. Bei den im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Paullon-*N*^δ-acetamiden **24a-m** konnte keine Vitalitäts- und Proliferationsinhibition an *T. cruzi*-Epimastigoten verzeichnet werden.

4.1.2 Durchflusszytometrieuntersuchungen mit infektiösen *T. b. brucei*

Der Einfluss der hergestellten Verbindungen auf die Vitalität und Proliferation der *T. b. brucei*-Blutform wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Bei dieser Methode werden mit Farbstoffen markierten Zellen einzeln an einer Lichtquelle vorbeigeführt, wobei die Zellen charakteristische Streulicht- und Fluoreszenz-emissionen aussenden. Diese können mit optischen Detektionssystemen erfasst und quantifiziert werden. Die verwendete Lichtquelle muss eine hohe Lichtintensität aufweisen um ausreichend Fluoreszenz- und Streusignale zu erzeugen. Die Wellenlänge des Lichts muss im Absorptionsbereich des eingesetzten Farbstoffs liegen und eine konstante Strahlungsleistung erbringen. In den durchgeführten Versuchen wurde ein 488 nm Festkörperlaser als Lichtquelle eingesetzt. Trifft der Strahl des Lasers auf eine Zelle, streut sie abhängig von der Querschnittsfläche der Zelle, der Struktur der Membran und der intrazellulären Bestandteile das einfallende Licht. Detektiert wird bei der Durchflusszytometrie sowohl die Vorwärtsstreuung (FSC) als auch die Seitwärtsstreuung (SSC). Zugleich mit dem gestreuten Licht werden im Durchflusszytometer Fluoreszenzfarben vermessen. Dazu werden Farbstoffe verwendet, welche an bestimmte Bestandteile der Zelle binden und unter dem Einfluss des Laserstrahls zum Fluoreszieren angeregt werden. Der von den Kooperationspartnern eingesetzte basische Farbstoff Propidiumiodid dringt in den sauren Zellkern ein und interkaliert dort in die DNA¹¹⁵⁻¹¹⁷.

Die antiproliferativen Aktivitäten der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten N^5 -unsubstituierten Paullone **20a-e** gegenüber *T. b. brucei* sind in Abbildung 32 dargestellt. Das Parasitenwachstum variiert in dieser Substanzklasse zwischen 12.9-102.2%. Anhand der Ergebnisse lässt sich feststellen, dass das in der Aufgabenstellung herausgearbeitete Paullongrundgerüst **20a** unter den N^5 -unsubstituierten Paullonen die beste Aktivität gegenüber *T. b. brucei* zeigt. Das Parasitenwachstum sinkt unter Zugabe der Testsubstanz **20a** in einer Konzentration von 5 μM auf 12.9%. Der Austausch des Bromsubstituenten in Position 9 durch einen *t*-Butylrest (Verbindung **20b**) hat keine signifikante Änderung der antiproliferativen Aktivität zur Folge. Durch die Einführung eines Methoxysubstituenten in Position 11 von **20a** (siehe Verbindung **20e**), geht die inhibitorische Aktivität des Paullons vollständig verloren. Die Einführung einer Methylgruppe am Indolstickstoff mit gleichzeitiger Substitution des Bromsubstituenten in 9-Position durch ein Wasserstoffatom führt ebenfalls zum Verlust der Parasitenwachstumsinhibition (siehe Abbildung 32, Verbindung **20c**).

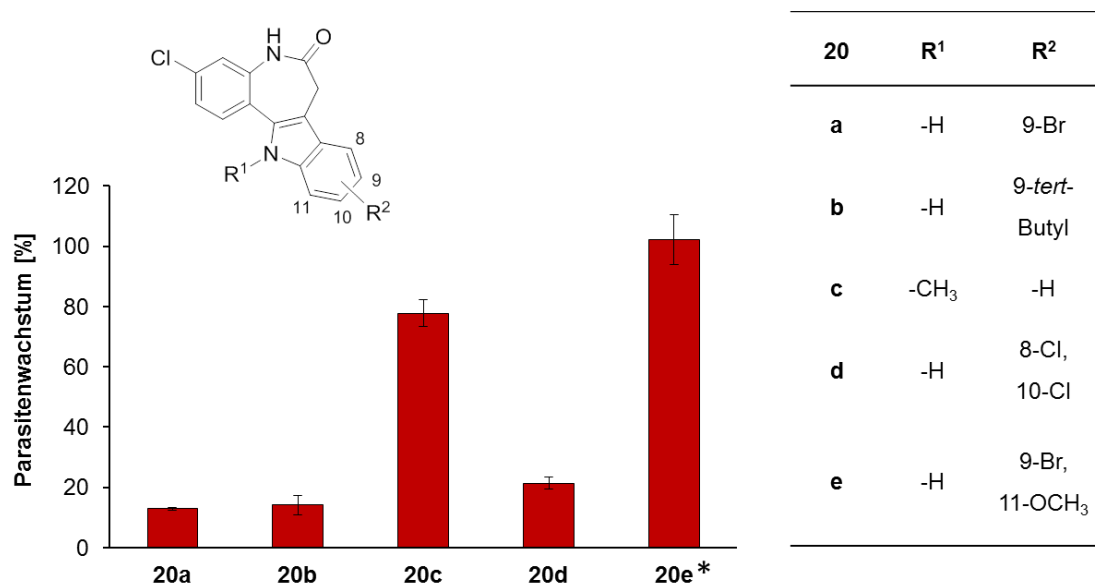


Abbildung 32: *T. b. brucei*-Parasitenwachstum unter Zusatz der N^5 -unsubstituierten Paullone; eingesetzte Konzentrationen: 5 μM , *: 30 μM ; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen von 3-4 Messungen dar ($\pm\sigma$).

In Abbildung 33 sind die Ergebnisse der Proliferationsuntersuchungen an *T. b. brucei* der Paullon- N^5 -essigsäureesterderivate **23a-c**, der Paullon- N^5 -pyrrolderivate **30** und **56**, dem Hydrazid **28** und der Säure **39** dargestellt. Das Essigsäurederivat **39**

hatte bei einer Konzentration von 30 μM lediglich eine moderate Inhibition des Parasitenwachstums um 38.8% zur Folge. Die Ester- und Pyrrolderivate zeigten ebenso wie das Hydrazid **28** bei einer Konzentration von 5 μM verglichen mit dem Paullongrundgerüst **20a** eine Verbesserung der antiproliferativen Aktivität auf ein Parasitenwachstum von 0.8-5.1%. Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Paullon- N^5 -essigsäureesterderivate **23a-c** lässt sich der schon bei den Proliferationsuntersuchungen an *T. cruzi* beobachtete Trend wiederfinden. Je sterisch anspruchsvoller der Esterrest ist (-Me bis -*tert*-Butyl), umso stärker inhibiert die Testsubstanz das Parasitenwachstum. Die Zugabe des *tert*-Butylesters **23c** zu *T. b. brucei* reduziert die Proliferation der Parasiten auf 1.2%.

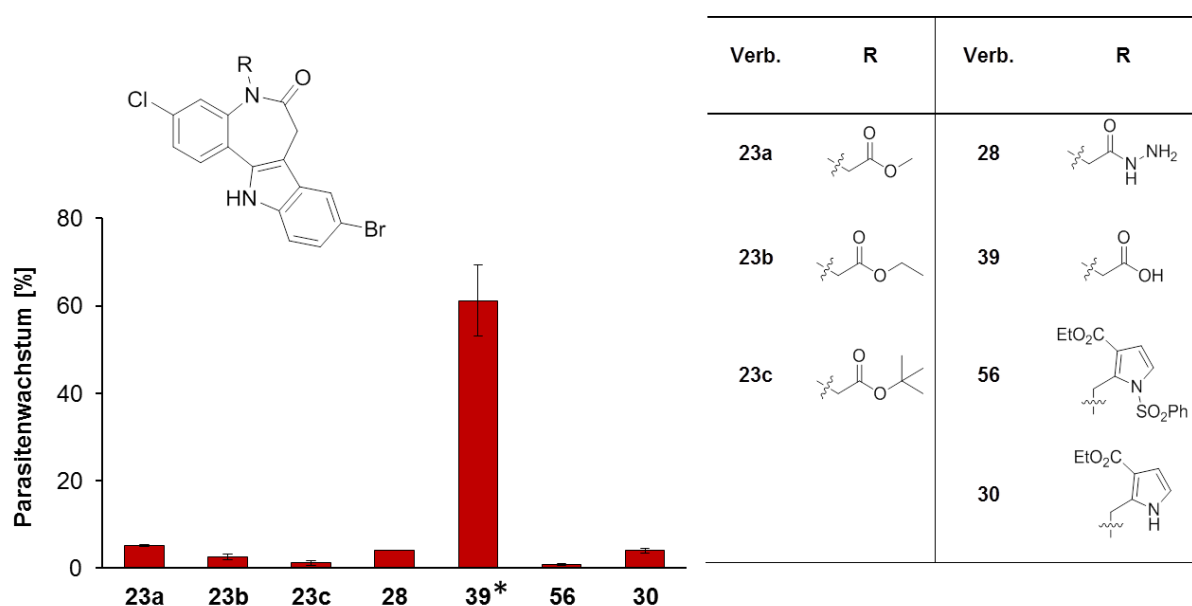


Abbildung 33: *T. b. brucei*-Parasitenwachstum unter Zusatz der N^5 -substituierten Paullone **23a-c**, **28**, **30**, **39** und **56**; eingesetzte Konzentrationen: 5 μM , *: 30 μM ; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen von 3-4 Messungen dar ($\pm\sigma$)

Beim Vergleich der Paullon- N^5 -pyrrolderivate **30** und **56** stellt die sterisch anspruchsvollere, mit der Phenylsulfonylschutzgruppe versehene Verbindung **56** gegenüber dem ungeschützten Pyrrolderivat **30** den potenteren Wachstumsinhibitor für *T. b. brucei* dar (siehe Abbildung 33). Der große räumliche Anspruch der Schutzgruppe scheint im Gegensatz zur Situation bei *T. cruzi* hier einen positiven Einfluss auf die Inhibition des entsprechenden Targets zu haben. Die zwei

Sauerstoffatome der Sulfonylgruppe könnten beispielsweise als Wasserstoffbrückenbindungsakzeptoren für stabilisierende Wechselwirkungen innerhalb der Bindetasche eines adressierten Targets dienen. Durch Entfernung dieser Schutzgruppe wie bei Verbindung **30** wären solche Wechselwirkungen nicht mehr möglich. Dies könnte eine Erklärung für die verglichen mit der Verbindung **56** verminderte antiproliferative Aktivität der Verbindung **30** sein.

Erstaunlicherweise zeigen die in Abbildung 34 dargestellten und an *T. cruzi* inaktiven Paullon-*N*⁵-acetamiderivate **24a-m** in einer Konzentration von 5 μ M an *T. b. brucei* sehr gute bis moderate antiproliferative Aktivitäten, was durch eine 65-99%ige Hemmung des Parasitenwachstums ausgedrückt wird. Eine Struktur-Wirkungsbeziehung ist anhand der ermittelten Daten jedoch nicht ersichtlich.

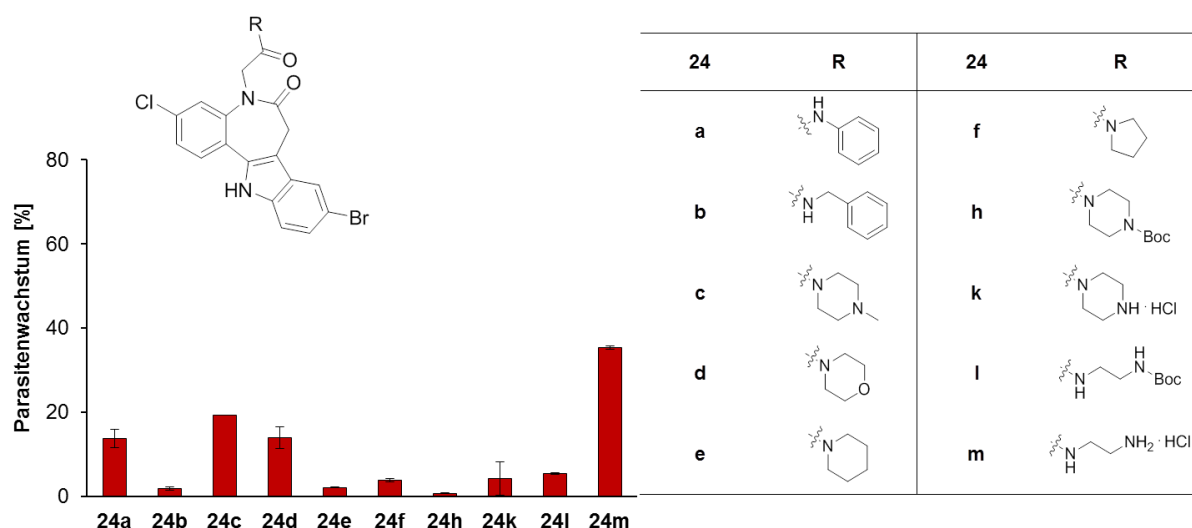
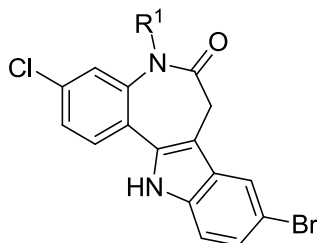


Abbildung 34: *T. b. brucei*-Parasitenwachstum unter Zusatz der *N*⁵-substituierten Paullone **24a-m**; eingesetzte Konzentrationen: 5 μ M; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen von 3-4 Messungen dar ($\pm\sigma$)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mehrere der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Paullone starke antiproliferative Wirkungen gegenüber *T. b. brucei* aufweisen. Bei Untersuchungen an infektiösen *T. b. brucei* zeigten zwölf Verbindungen eine Wachstumsinhibition der Parasiten > 90%. Von diesen wurden EC₅₀-Werte ermittelt, wobei sechs der Testverbindungen EC₅₀-Werte im submikromolaren Bereich aufwiesen (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: EC₅₀-Werte^{a)} der Proliferationsinhibition der Verbindungen **23b**, **23c**, **24b**, **24h**, **24k** und **56** an *T. b. brucei*-Parasiten.



Verb.	R ¹	EC ₅₀ [nM]	Verb.	R ¹	EC ₅₀ [nM]
56		110 ± 10	24b		40 ± 20
23b		170 ± 30	24h		310 ± 80
23c		130 ± 10	24k		430 ± 210

Erläuterung: ^{a)} Mittelwerte ± Standardabweichung durch Doppel- oder Dreifachbestimmung.

Als potentester Proliferationsinhibitor an *T. b. brucei* stellte sich das Benzylamid **24b** mit einem EC₅₀-Wert von 40 nM heraus. Die Piperazinamide **24h** und **24k** sind zwei weitere submikromolare Inhibitoren aus der Substanzklasse der Paullon-*N*⁵-acetamide. Der beobachtete Reaktivitätstrend der Esterderivate **23a-c** findet sich auch bei der Betrachtung der EC₅₀-Werte wieder. Der EC₅₀-Wert des *tert*-Butylesters **23c** ist 130 nM, der des Ethylesters **23b** 170 nM und der des Methylesters **23a** liegt bei > 1 µM. Mit der Verbindung **56** ist auch ein Vertreter der Substanzklasse der Paullon-*N*⁵-pyrrolderivate bei den submikromolaren Inhibitoren vertreten.

4.2 Inhibition der Trypanothionsynthetasen

Zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität der synthetisierten Verbindungen gegenüber den TryS-Proteinen der untersuchten Parasitenspezies (*TbTryS*, *TcTryS* und *LiTryS*) wurde eine photometrische Phosphatbestimmungsmethode durchgeführt, das Malachitgrün-Verfahren. Das Prinzip dieser einfachen sensitiven Methode besteht darin, dass das nachzuweisende freie Phosphat unter sauren Bedingungen zunächst einen gelben Komplex mit zusätzlich zugefügtem Ammoniummolybdat bildet. Der Triphenylmethanfarbstoff Malachitgrün bindet anschließend mit dem entstandenen Phosphomolybdat zu einem grünen Komplex, welcher sich bei einer Wellenlänge von 620-650 nm detektieren lässt¹¹⁷⁻¹²⁰. Die Ergebnisse der Enzymaktivitätstests an *TbTryS* und *LiTryS* sind in den folgenden Abbildungen dargestellt. Die Testungen der inhibitorischen Aktivitäten der synthetisierten Verbindungen an der *TcTryS* waren zur Zeit der Niederlegung dieser Arbeit noch nicht beendet und wurden deswegen nicht mit aufgenommen.

Mit Ausnahme der Verbindungen **24a** und **24b** inhibieren alle Testsubstanzen die *LiTryS* stärker als die *TbTryS*. Ein Erklärungsansatz dafür könnte der zwischen den Spezies strukturell variierende Spalt sein, welcher an die ATP-Bindetasche der Proteine angrenzt. *N*⁵-substituierte Paullone binden mit der in der 5-Position angeknüpften Seitenkette in diesem Spalt⁶⁰. Je enger der Spalt, desto sterisch eingeschränkter ist die Struktur des potentiellen Inhibitors. Möglicherweise ist der Spalt der *TbTryS* schmaler als der der *LiTryS*, wodurch die *TbTryS* von sterisch anspruchsvolleren Inhibitoren schlechter adressiert werden kann¹²¹. Unter der Annahme, dass die *N*⁵-Seitenketten der Testverbindungen ebenfalls in diesem Spalt positioniert sind, lassen sich die Aktivitätsunterschiede zwischen *TbTryS* und *LiTryS* teilweise erklären.

In der Abbildung 35 sind die TryS-inhibitorischen Aktivitäten für die Verbindungen **20a-e** der Substanzklasse der *N*⁵-unsubstituierten Paullone dargestellt. Keine der Substanzen **20a-e** reduziert die TryS-Aktivitäten der beiden Parasitenspezies in Konzentrationen von 30 µM um mehr als 50% (siehe Abbildung 35). Die Unterschiede der antitrypanosomalen Aktivitäten der Verbindungen **20a-e** an *TbTryS* und *LiTryS* sind vergleichsweise gering.

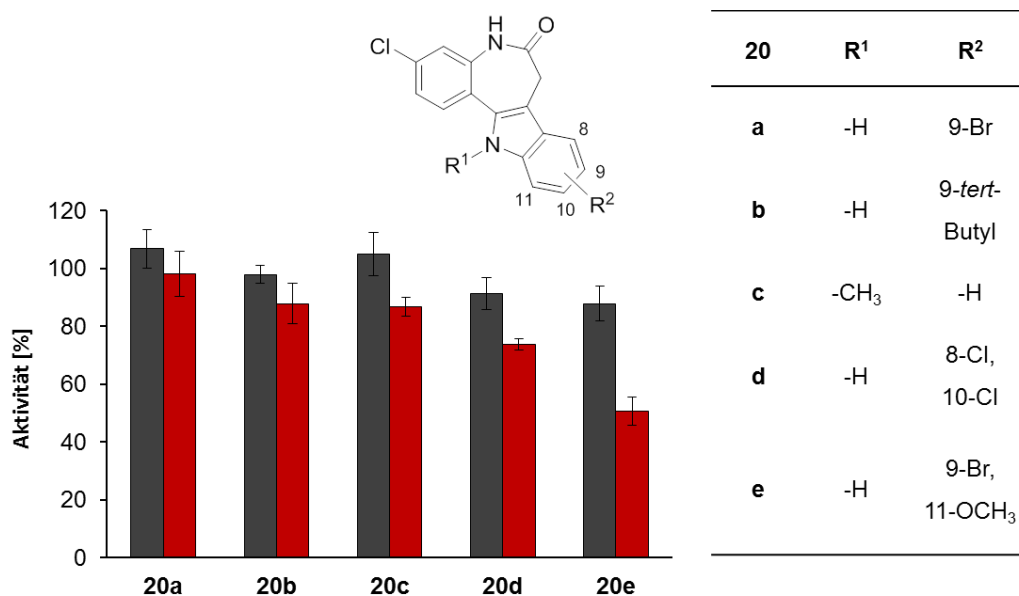


Abbildung 35: Restaktivität der *TbTryS* (schwarz dargestellt) und der *LTryS* (rot dargestellt) in Gegenwart von 30 μ M der Testverbindungen **20a-e**; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen von 3-5 Messungen dar ($\pm\sigma$).

Im Gegensatz zu den *N*⁶-unsubstituierten Paullonen **20a-e** zeigen die Paullon-*N*⁶-essigsäureesterderivate **23a-c** und das Hydrazid **28** deutlich variierende Restaktivitäten der TryS-Proteine der unterschiedlichen Parasiten (siehe Abbildung 36). Während die Inhibition der *TbTryS*-Aktivität unter der Verwendung der Testsubstanzen **23a-c** und **28** in Konzentrationen von 30 μ M bei maximal 28.9% lag, konnte die *LTryS*-Aktivität durch diese Substanzen bis zu einer Restaktivität von 14.1% inhibiert werden. Da die EC₅₀-Werte der Proliferationsuntersuchungen an *T. b. brucei* für Verbindung **23b**, **23c** und **28** in Konzentrationen von 5 μ M im mikromolaren Bereich liegen, die *TbTryS* von diesen Substanzen bei einer Konzentration von 30 μ M aber lediglich < 30% gehemmt wird, liegt die Vermutung nahe, dass zusätzlich zu der *TbTryS* ein anderes, bisher unbekanntes Target adressiert wurde.

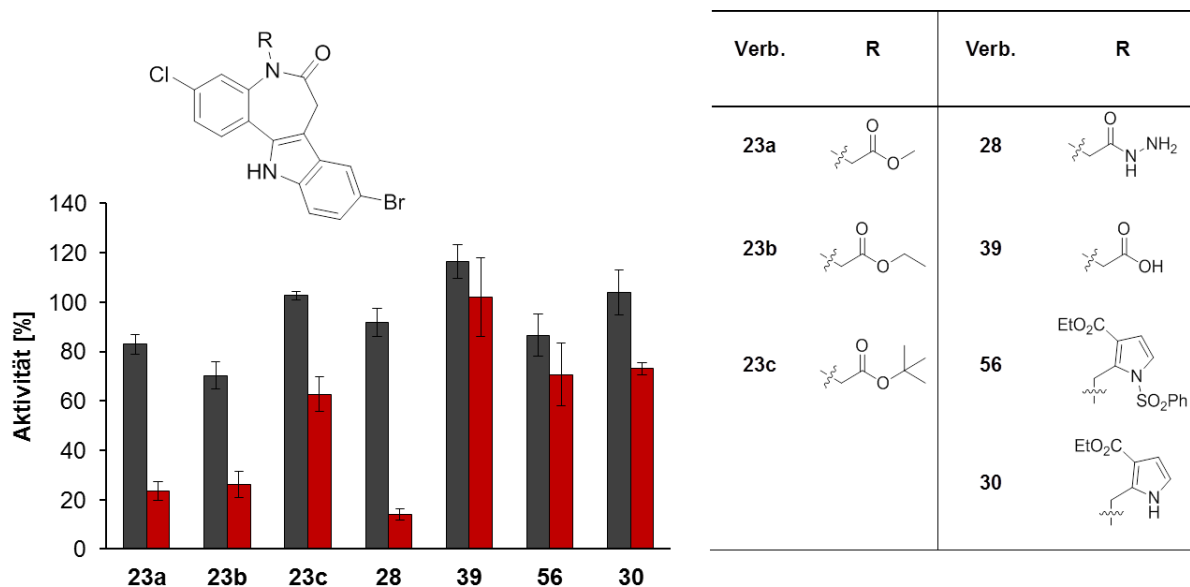


Abbildung 36: Restaktivität der *TbTryS* (schwarz dargestellt) und der *LfTryS* (rot dargestellt) in Gegenwart von 30 µM der Testverbindungen **23a-c**, **28**, **30**, **39** und **56**; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen von 3-5 Messungen dar ($\pm\sigma$).

Die Anknüpfung eines Essigsäurerestes an die Position 5 des Paullon-Grundgerüsts **20a** (wie bei Verbindung **39**), oder dieselbige mit Pyrrolderivaten zu den Produkten **56** und **30** führte nicht zu einer Steigerung der Inhibition der Enzymaktivität von *LfTryS* und *TbTryS*. Auch hier sind die Unterschiede zwischen den Aktivitäten an den TryS der verschiedenen Parasitenspezies vergleichsweise gering. Die Vermutung liegt nahe, dass die *N*⁵-Substituenten der Verbindungen **30**, **39** und **56** keine Wechselwirkungen mit dem engen Spalt nahe der ATP-Bindetasche eingehen und somit ein weniger großer Aktivitätsunterschied resultiert. Insbesondere schwache Inhibitionen durch die sterisch anspruchsvollen Pyrrolsubstituenten der Verbindungen **30** und **56** lassen darauf schließen, dass deren Positionierung in diesen beengten Zwischenräumen problematisch ist.

In Abbildung 37 sind die inhibitorischen Aktivitäten der Paullon-*N*⁵-acetamidderivate **24a-m** an den TryS-Proteinen der Parasiten *L. infantum* und *T. b. brucei* dargestellt.

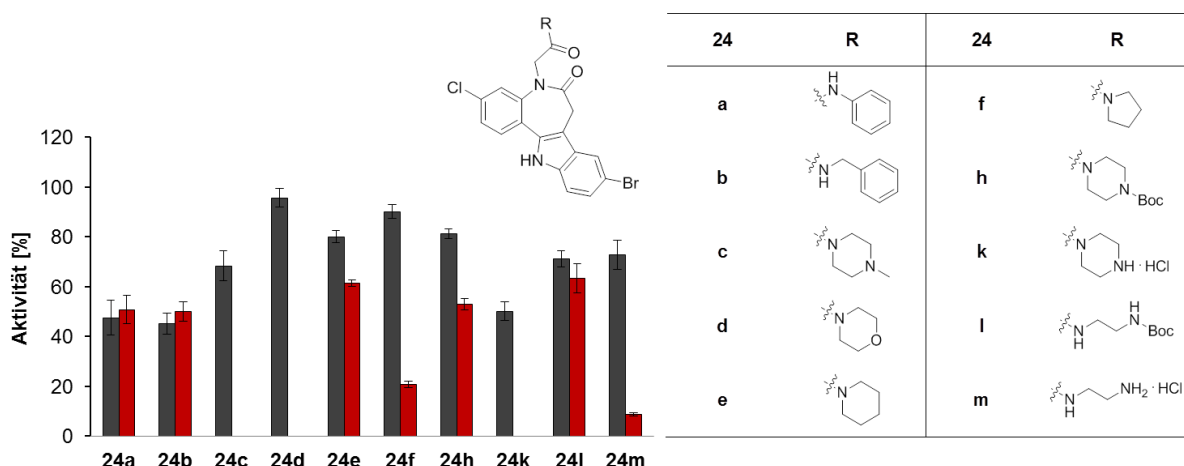


Abbildung 37: Restaktivität der *TbTryS* (schwarz dargestellt) und der *LfTryS* (rot dargestellt) in Gegenwart von 30 μ M der Testverbindungen **24a-m**; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen von 3-5 Messungen dar ($\pm\sigma$). Bei **24c**, **24d** und **24k** war die Restaktivität der *LfTryS* unter diesen Bedingungen < 5%.

Bei einer Konzentration von 30 μ M inhibieren die Phenyl- bzw. Benzylamiderivate **24a** und **24b** die TryS beider Parasiten zu ~50%. Ein eindeutiger Inhibitionsunterschied zwischen den zwei Enzymen ist im Falle dieser beiden Verbindungen nicht zu verzeichnen. Vorstellbar wäre, dass die planare Struktur der *N*⁵-Substituenten der Verbindungen **24a** und **24b** sowohl in den Spalt der *LfTryS* als auch in den vermutlich engeren Zwischenraum der *TbTryS* passen und sich daher kein signifikanter Aktivitätsunterschied ergibt. Diese Hypothese wird durch die *docking*-Posen der Verbindungen **24a** und **24b** in der ATP-Bindetasche der *TbTryS* untermauert (Abbildung 38 und Abbildung 39). Die Testsubstanzen wurden dabei mit GOLD in ein von Herrn O. Koch mittels MOE angefertigtes Homologiemodell der *TbTryS* gedockt, welches auf der *LmTryS*-Röntgenkristallstruktur basiert¹²¹. Die hellgrünen Linien in Abbildung 38 und Abbildung 39 stellen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den *N*⁵-Substituenten und dem Phe580 innerhalb des Spalts nahe der ATP-Bindetasche dar. Sowohl der Lactamsauerstoff als auch die Amidstrukturen der Verbindungen **24a** und **24b** gehen stabilisierende Interaktionen innerhalb der Bindetasche ein. Mit Hilfe dieser Abbildungen wird auch deutlich, dass der Phenylrest der Verbindung **24a** und der Benzylrest der Verbindung **24b** räumlich sehr gut in den engen Spalt der *TbTryS* hineinpassen, wodurch auch ersichtlich wird, dass für sterisch anspruchsvollere Reste eine Platzierung in diesem Spalt problematisch zu sein scheint.

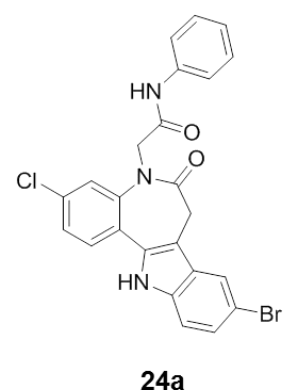
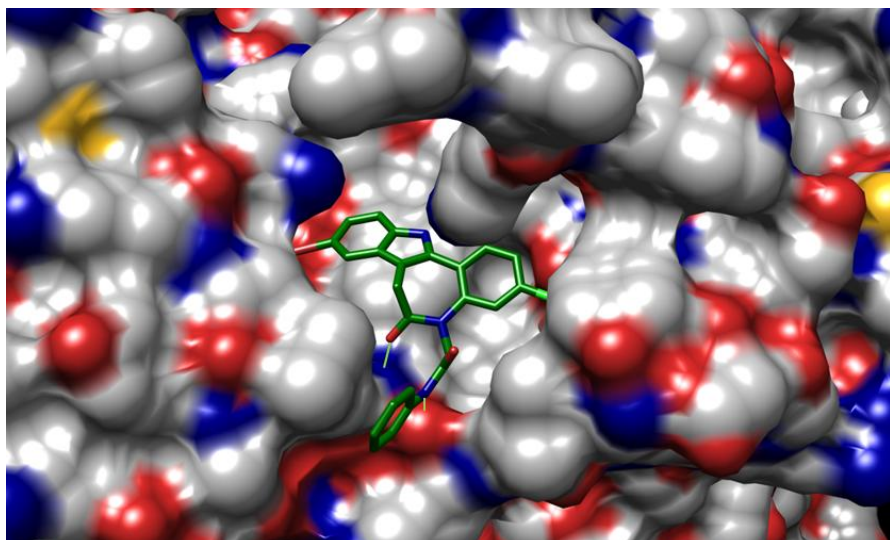


Abbildung 38: Dockingpose von **24a** in die ATP-Bindetasche der *TbTryS* (gedockt wurde mit GOLD (ChemPLP *scoring function*) in das mit MOE angefertigte *TbTryS* Homologiemodell auf Basis der *LmTryS* Röntgenkristallstruktur 2vps); die hellgrünen Linien zeigen Wasserstoffbrückenbindungsinteraktionen zum Phe580.

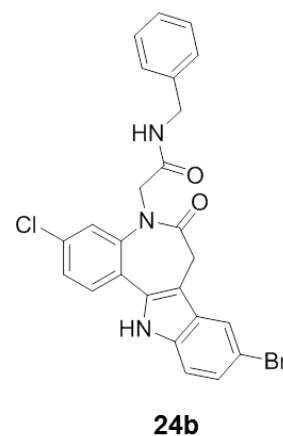
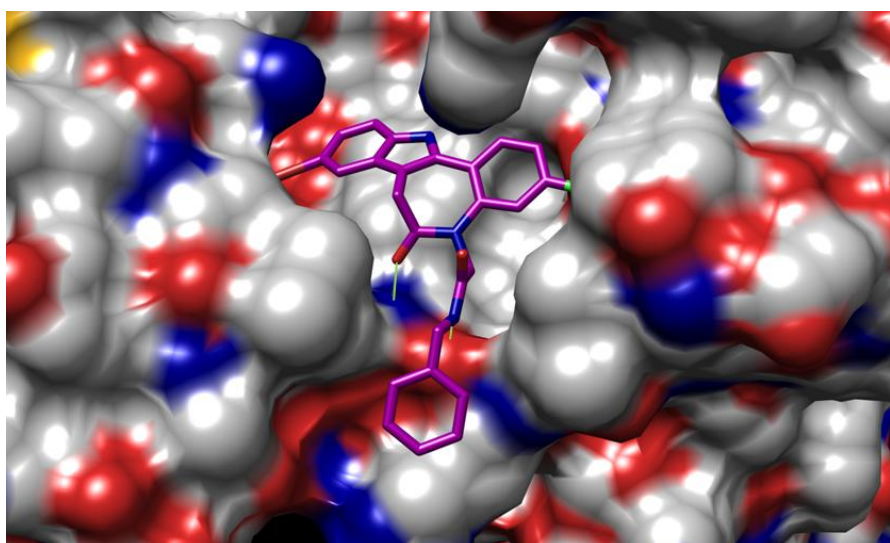
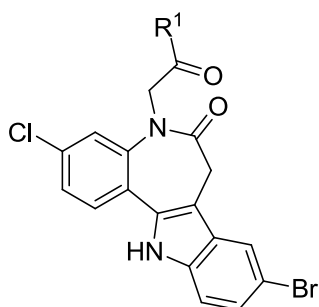


Abbildung 39: Dockingpose von **24b** in die ATP-Bindetasche der *TbTryS* (gedockt wurde mit GOLD (ChemPLP *scoring function*) in das mit MOE angefertigte *TbTryS* Homologiemodell auf Basis der *LmTryS* Röntgenkristallstruktur 2vps); die hellgrünen Linien zeigen Wasserstoffbrückenbindungsinteraktionen zum Phe580.

Im Falle der Acetamidderivate **24c-m** sind die Aryl- bzw. Alkylamidreste nicht planar und deshalb sterisch anspruchsvoller. Die Restaktivitäten der *TbTryS* lagen unter dem Einfluss der Testverbindungen **24c-m** in einer Konzentration von 30 μM bei > 50%. Die Restaktivitäten der *LTryS* waren unter Zugabe der Verbindungen **24c**, **24d** und **24k** in einer Konzentration von 30 μM kleiner als 5%. Eine genaue Bestimmung der Aktivitäten dieser Testsubstanzen in Prozent wurde nicht durchgeführt, weshalb diese auch nicht in Abbildung 37 verzeichnet sind. Die Bestimmung der IC_{50} -Werte der potentesten Testsubstanzen zeigte, dass es sich bei den Acetamidderivaten **24c**, **24f**, **24k** und **24m** um submikromolare Inhibitoren der *LTryS* handelt (siehe Tabelle 11). Das Paullon **24m** stellt im Rahmen der in dieser Arbeit synthetisierten Derivate den potentesten *LTryS*-Inhibitor mit einem IC_{50} -Wert von 269 nM dar. Auch die Paullone mit Piperazin- und Pyrrolidinamidresten **24c**, **24k** und **24f** inhibieren die *LTryS* Aktivität im submikromolaren Bereich, wohingegen das ebenfalls zyklische Morpholinderivat **24d** mit einem IC_{50} -Wert von 2.8 μM eine schwächere Aktivität gegenüber der *LTryS* aufweist. Der Unterschied zwischen den Aktivitäten des Methylpiperazinderivats **24c** an den TryS-Proteinen der verschiedenen Parasitenspezies kann mit Hilfe der Abbildung 40 und der Abbildung 41 erläutert werden. Während sich die Testsubstanz **24c** problemlos in die Bindetasche der *LTryS* (basierend auf einem Homologiemodell von Herrn O. Koch) platzieren ließ, konnte für das *TbTryS*-Modell kein vernünftiger Bindemodus generiert werden. Bei der Betrachtung der leeren *TbTryS*-Bindetasche fällt auf, dass der Spalt nahe der ATP-Bindetasche viel schmaler ist als bei der *LTryS*. Dadurch kann der Methylpiperazinamidrest der Verbindung **24c** nicht mehr in diesem platziert werden, wodurch die inhibitorische Aktivität der Testsubstanz gegenüber *TbTryS* verglichen mit der gegenüber *LTryS* sinkt.

Der Vergleich der inhibitorischen Aktivitäten an *LTryS* zwischen den Verbindungen **24h** und **24k** und zwischen **24l** und **24m** zeigt, dass die inhibitorischen Aktivitäten durch die Entfernung der Boc-Schutzgruppen zunehmen. Durch die Abspaltung der Schutzgruppen sinkt der sterische Anspruch der Testverbindungen, sodass höchstwahrscheinlich die Adressierung des Spalts nahe der ATP-Bindetasche der *LTryS* möglich wird. Durch die postulierten, über den N^5 -Substituenten vermittelten Wechselwirkungen zum Spalt könnten so die besseren inhibitorischen Aktivitäten der Verbindungen **24k** und **24m** gegenüber den Boc-geschützten Analoga **24h** und **24l** erklärt werden.

Tabelle 11: IC₅₀-Werte^{a)} der inhibitorischen Aktivität der Testverbindungen **23a**, **23c**, **24c**, **24d**, **24f**, **24k**, **24m** und **28** gegenüber der *L*TryS.


Verb.	R ¹	IC ₅₀ [μM]	Verb.	R ¹	IC ₅₀ [μM]
23a		3.0±0.7	24f		0.52±0.20
23c		2.4±0.3	24k		0.31±0.03
24c		0.40±0.07	24m		0.27±0.02
24d		2.8±0.7	28		4.0±0.5

 Erläuterung: ^{a)} Mittelwerte ± Standardabweichung durch Doppel- oder Dreifachbestimmung.

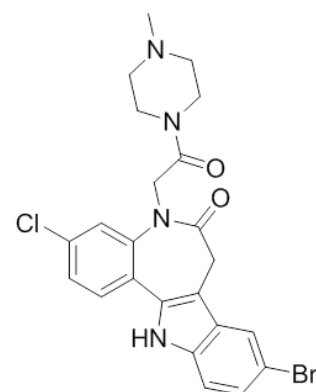
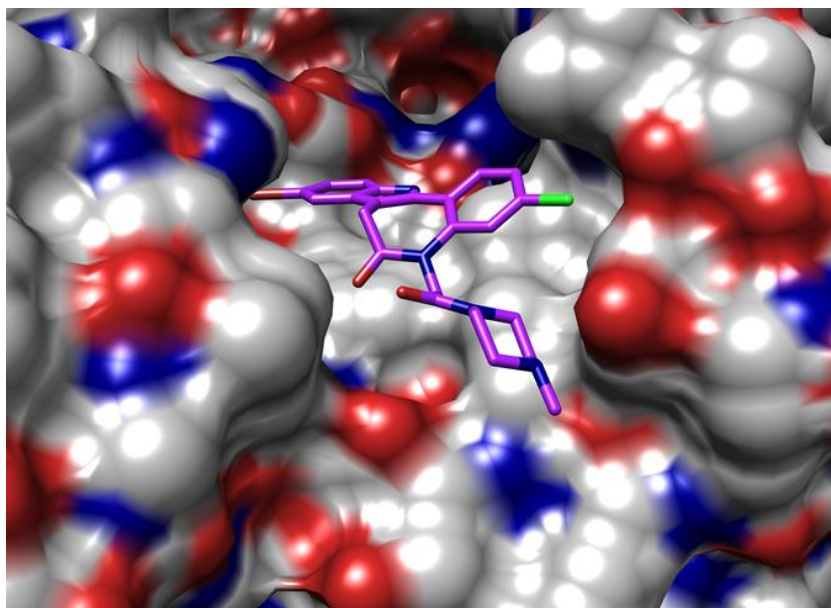

24c

Abbildung 40: Dockingpose von **24c** in der ATP-Bindetasche der *L*TryS (gedockt wurde mit GOLD (ChemPLP *scoring function*) in das mit MOE angefertigte *L*TryS Homologiemodell auf Basis der *Lm*TryS Röntgenkristallstruktur 2vps).

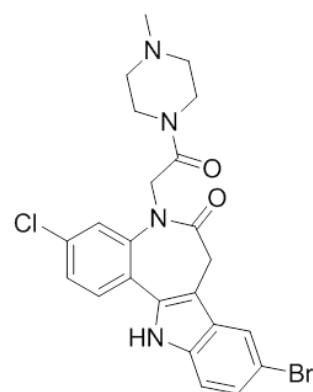
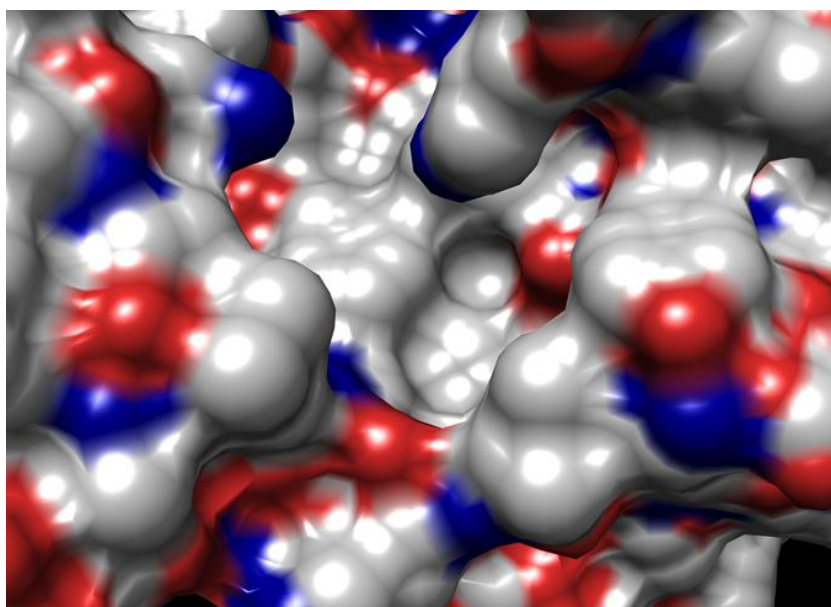

24c

Abbildung 41: ATP-Bindetasche der *Tb*TryS des mit MOE angefertigten *Tb*TryS Homologiemodells auf Basis der *Lm*TryS Röntgenkristallstruktur 2vps; beim *docking* von **24c** mit GOLD konnte keine geeignete Position innerhalb der Bindetasche gefunden werden.

4.3 Zytotoxizitätsuntersuchungen

Mit einigen ausgewählten Endverbindungen (**23a**, **23b**, **23c**, **24b**, **24c**, **24f**, **24h**, **24k**, **30**, **56**) wurden Toxizitätsuntersuchungen an den als Wirtszellen fungierenden Makrophagen mit Hilfe des xCELLigence™ Systems durchgeführt. Das System beruht auf mikroelektronischen Biosensoren, welche am Boden jeder Kavität einer 96-*well*-Platte eingebaut sind (spezielle *E-Plates*). Diese Sensoren messen die elektrische Impedanz, d. h. den Wechselstromwiderstand der Zellen in der Kavität, welcher durch den Kontakt der Zellen zum Sensor zustande kommt. Je mehr Zellen mit der Elektrode in Kontakt stehen, desto höher ist die Impedanz (siehe Abbildung 43). Die Sensoren oder auch RTCAs (*Real Time Cell Analyzer*) liefern quantitative Echtzeitinformationen über den Status der Zellen, was Aussagen über die Zellanzahl, die Zellmorphologie, die Adhäsionsfähigkeit und die Überlebensfähigkeit der Zellen erlaubt. Die elektrische Impedanz wird als dimensionsloser Zellindex (CI) angegeben. Der CI zeigt die relative Änderung der gemessenen Impedanz in der Kavität. Sind keine Zellen in der Kavität, ist der CI = 0. Unter gleichen physiologischen Bedingungen gilt: je mehr Zellen in der Kavität sind, desto höher ist der Zellindex (siehe Abbildung 43). Eine Änderung im Zellstatus, egal ob Zellmorphologie, Zelladhäsion oder Zelltod, führt zu einer Änderung der Zellindices¹²²⁻¹²³.

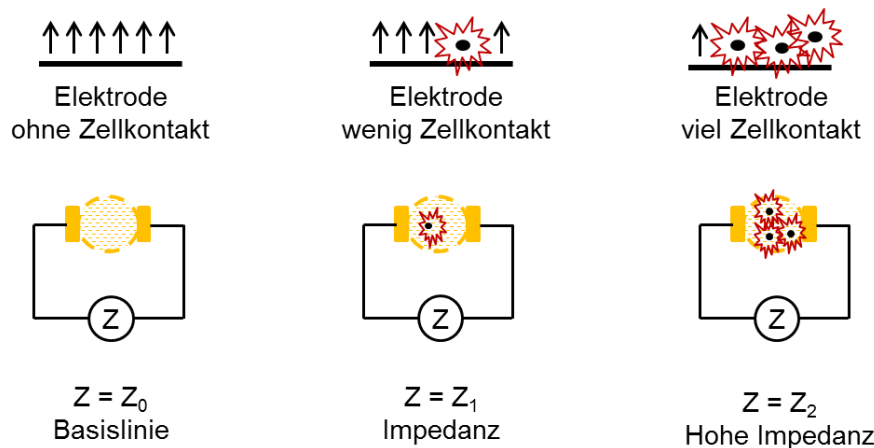


Abbildung 43: Schematische Beschreibung der Impedanz durch die Zellen in der Kavität.

Die für Toxizitätsuntersuchungen eingesetzten Makrophagen weisen eine hohe Adhäsionsneigung auf. Nach dem Aussäen der Zellen in die Kavitäten der *E-Plate* VIEW 96 (7.5×10^4 Zellen/50 μ L und Kavität) mussten sich diese erst in der Kavität absetzen (mind. 4 h). So konnten nach einigen Stunden Messdauer im xCELLigence System konstante Zellindices verzeichnet werden. Anschließend wurden die synthetisierten Testsubstanzen hinzugegeben und deren Auswirkungen auf den Status der Zellen aufgezeichnet. Zudem wurden Positivkontrollen unter Zugabe von LPS (10 ng/mL), Negativkontrollen unter Zugabe von Staurosporin (3 μ M), Versuche unter Zugabe von 0.1% DMSO und Versuche ohne Zugabe von Testsubstanzen (nur Medium und Mausmakrophagen) durchgeführt. Die CI Basislinie wurde durch Versuche mit reinem Medium ohne Zugabe von Zellen bestimmt.

Tabelle 12: Zytotoxizitätsuntersuchungen an Mausmakrophagen in den von der Löslichkeit der jeweiligen Verbindungen abhängigen Maximalkonzentrationen.

Verbindung	Zytotoxizität [%] ^{a)}	Konzentration [μ M]
23a	32.57 \pm 7.32	48
23b	54.16 \pm 4.18	49
23c	41.90 \pm 0.07	44
24b	19.00 \pm 1.95	30
24c	60.64 \pm 6.73	30
24f	32.56 \pm 7.32	44
24h	27.73 \pm 4.50	26
24k	71.03 \pm 13.09	29
30	32.20 \pm 1.60	42
56	35.68 \pm 1.93	33

Erläuterung: ^{a)} Der Zellindex der Medium-Kontrolle zum Zeitpunkt 48 h wurde gleich 100% gesetzt und die Indices der Testsubstanzen beim Zeitpunkt 48 h darauf bezogen. Das Ergebnis entspricht der Vitalität in %. Die Zytotoxizität ergibt sich anschließend aus folgender Rechnung: 100% - %Vitalität = % Zytotoxizität.

Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsuntersuchungen sind in Tabelle 12 dargestellt. Die eingesetzten Konzentrationen hängen mit der Löslichkeit der jeweiligen Verbindungen zusammen. Das Benzylamid **24b**, der in dieser Arbeit potenteste Proliferationsinhibitor an *T. b. brucei*, zeigte die geringste Toxizität aller getesteten Verbindungen mit 19% bei einer Konzentration von 30 μM . Das Piperazinamid **24k**, welches die *L*TryS im submikromolaren Bereich inhibiert, weist bei einer Konzentration von 29 μM mit 71% die höchste Zytotoxizität der getesteten Verbindungen auf.

5 Zusammenfassung

Die Parasiten der Gattungen *Leishmania* und *Trypanosoma* sind die Auslöser der Tropenkrankheiten Leishmaniose, Afrikanische Schlafkrankheit und Chagas. Neuartige Wirkstoffe für die Behandlung dieser parasitären Infektionen werden auf Grund bisher mangelhafter Therapiemöglichkeiten dringend benötigt. Die Krankheitserreger verfügen über ein einzigartiges Trypanothionsystem zur Erhaltung der Redoxbalance, welches im Menschen nicht vorhanden ist. Die Inhibition dieses Systems könnte zu Wirkstoffen führen, welche mit weniger Nebenwirkungen verbunden sind als die heutzutage eingesetzten Arzneistoffe. Die Trypanothion-synthetase (TryS) ist ein essentielles Schlüsselenzym in der Trypanothion-biosynthese und stellt im Rahmen dieser Arbeit das adressierte Target dar. Aus bereits publizierten Arbeiten war bekannt, dass am Lactamstickstoff substituierte Paullone als niedrig nanomolar wirksame Inhibitoren der TryS des nicht humanpathogenen Einzellers *Crithidia fasciculata* (CfTryS) fungieren. Jedoch wiesen diese Verbindungen bei den Testungen an den TryS-Proteinen der Leishmanien bzw. Trypanosomen weitaus geringere inhibitorische Aktivitäten auf. Mit dem Ziel, die Aktivität gegenüber den TryS-Enzymen zu optimieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit ausgehend vom 3-Chlor-Kenpaullon-Grundgerüst **20a** weitere *N*⁵-substituierte Paullone hergestellt.

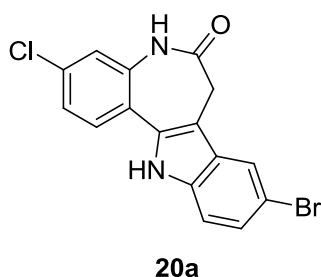


Abbildung 44: Das Grundgerüst für Derivatisierungen am Lactamstickstoff.

In Anlehnung an den bisher potentesten CfTryS-Inhibitor auf Paullonbasis (**22**, $IC_{50} = 30$ nM, siehe Abbildung 45) wurde eine Reihe an Acetamidderivaten **24** synthetisiert. Desweiteren wurden strukturverwandte Essigsäureesterderivate (**23a-c**) hergestellt (siehe Abbildung 46).

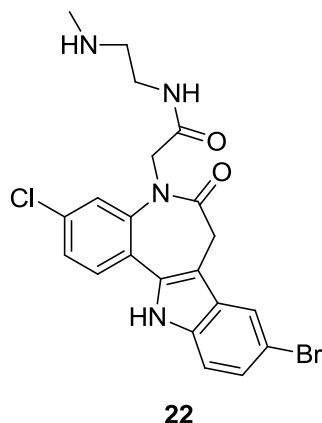
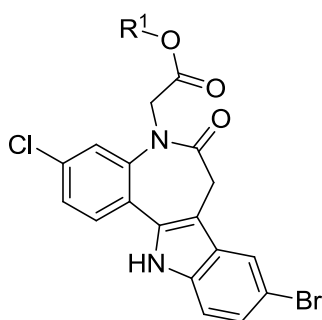
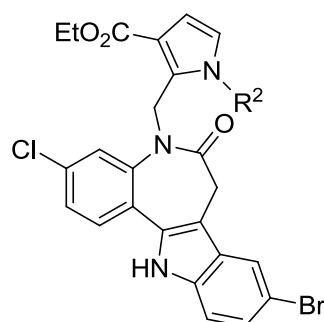


Abbildung 45: Potentester literaturbekannter CfTryS-Inhibitor mit Paullongrundstruktur ($IC_{50} = 30$ nM).

Ein weiteres Teilprojekt bestand in der Anknüpfung eines Pyrrolderivats an die N^5 -Position der Grundstruktur **20a** mit anschließender Derivatisierung zu den Verbindungen **30** und **56** (siehe Abbildung 46). Alle synthetisierten Endstrukturen wurden biologisch evaluiert.



23a: $R^1 = \text{Me}$
23b: $R^1 = \text{Et}$
23c: $R^1 = \text{tert-Butyl}$



30: $R^2 = \text{H}$
56: $R^2 = \text{SO}_2\text{Ph}$

Abbildung 46: Struktur der hergestellten Essigsäureesterderivate **23a-c** und der Pyrrolderivate **30** und **56**.

Proliferationsuntersuchungen an *T. cruzi*-Parasiten lieferten im Falle der Essigsäureesterderivate **23a-c** und der Pyrrolderivate **30** und **56** IC_{50} -Werte im zweistellig mikromolaren Bereich. Die Acetamidderivate **24** wiesen keine anti-proliferativen Eigenschaften gegenüber *T. cruzi*-Parasiten auf. Bei Proliferationsuntersuchungen an *T. b. brucei*-Parasiten wurden die Essigsäureesterderivate **23b** und **23c**, die Acetamidderivate **24b**, **24h**, **24k** und das Pyrrolderivat **56** als submikromolare Inhibitoren ermittelt. Das Benzylamidderivat **24b** stellt mit einem EC_{50} -Wert von 40 nM den potentesten *T. b. brucei*-Proliferationsinhibitor im Rahmen dieser Arbeit dar (siehe Abbildung 47).

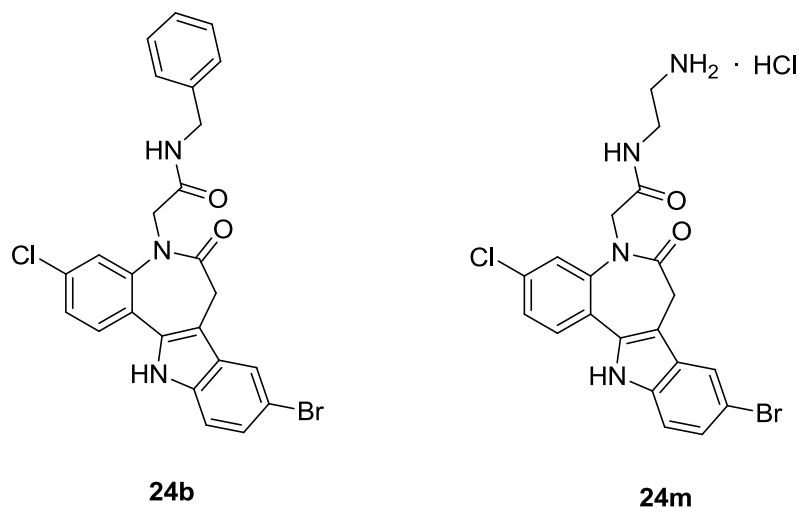


Abbildung 47: Die potentesten in dieser Arbeit hergestellten Verbindungen; **24b**: *T. b. brucei* Proliferation: EC_{50} = 40 nM, *TbTryS*-Restaktivität 45% bei 30 μ M; **24m**: *LiTryS*-Inhibition: IC_{50} = 269 nM.

Zudem ergaben Zytotoxizitätsuntersuchungen an Mausmakrophagen bei einer Konzentration von 30 μ M **24b** eine geringe Zytotoxizität von 19%. Die Enzymassays an der *TbTryS* verdeutlichten aber, dass die TryS nicht das einzige durch **24b** adressierte Target in den *T. b. brucei*-Parasiten sein kann, weil sich bei einer Konzentration von 30 μ M noch eine Restaktivität der *TbTryS* von 45% verzeichnen ließ. Im Gegensatz zur *LiTryS* wurde die *TbTryS* von keiner der Testsubstanzen bei Konzentrationen von 30 μ M stärker als 55% inhibiert.

Die Untersuchungen der inhibitorischen Eigenschaften der Testsubstanzen gegenüber der *L*TryS zeigten, dass die Paullon-*N*⁶-acetamide **24c**, **24f**, **24k** und **24m** die *L*TryS im submikromolaren Bereich inhibieren. Die potenteste im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Substanz gegenüber der *L*TryS mit einem IC₅₀-Wert von 269 nM ist das Acetamidderivat **24m** (siehe Abbildung 47).

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, mehrere submikromolar wirksame *L*TryS-Inhibitoren zu synthetisieren. Das Acetamidderivat **24m** ist der bisher potenteste Inhibitor der *L*TryS auf Paullonbasis¹²⁴. Diese Verbindung stellt eine gute Leitstruktur für weitere Derivatisierungen im Hinblick auf Hemmstoffe der Trypanothionsynthetasen der Leishmanien und Trypanosomen dar.

6 Summary

The parasites of the genus *Leishmania* and *Trypanosoma* cause the tropical diseases leishmaniasis, african sleeping sickness and chagas. Because of deficient existing therapies new drugs for the treatment of these parasitical infections are needed urgently. The causative organism possesses a unique trypanothione redox system to maintain the redox balance, which is absent in humans. The inhibition of this system could potentially lead to drugs with low side effects. The trypanothione synthetase (TryS) is an essential key enzyme which is involved in the trypanothione biosynthesis. In this thesis, the TryS is the addressed target. Recent publications describe paullones which are substituted at the lactam nitrogen as submicromolar TryS inhibitors of the unicellular non-pathogenic microorganism *Crithidia fasciculata* (CfTryS). However, these paullones disappointed when tested at the TryS proteins of *Leishmania* and *Trypanosoma*. The aim of this work was to optimize the activity of *N*⁶-substituted paullones against the TryS enzymes of *Trypanosoma* and *Leishmania* parasites. Therefore, starting from the 3-chloro-kenpaullone scaffold **20a** a series of *N*⁶-substituted paullones was synthesized.

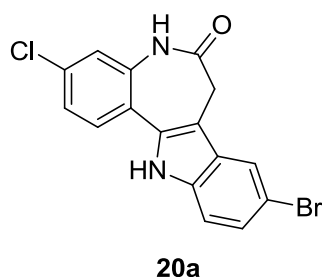


Figure 1: The paullone scaffold for further derivations at the lactam nitrogen.

Referring to the most potent *CfTryS* inhibitor based on a paullone scaffold (**22**, $IC_{50} = 30$ nM, Figure 2), the acetamide derivatives **24** were synthesized. In addition, the acetic acid ester derivatives **23a-c** were produced (Figure 3).

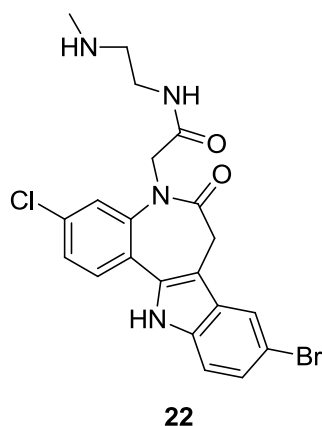


Figure 2: The most potent published *CfTryS* inhibitor based on a paullone scaffold ($IC_{50} = 30$ nM).

Another part of this project consisted of the synthesis of pyrrole derivatives connected to the *N*⁵-nitrogen of the paullone scaffold **20a** through a methylene group (Figure 3). All synthesized structures were biologically evaluated.

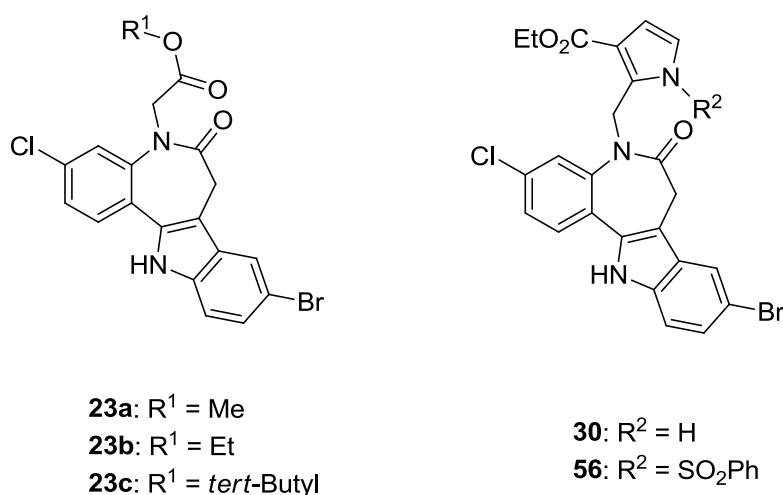


Figure 3: Synthesized acetic acid ester derivatives **23a-c** and pyrrole derivatives **30** and **56**.

Proliferation assays for *T. cruzi* parasites provided IC_{50} values in double digit micromolar ranges for the acetic acid ester derivatives **23a-c** and the pyrrole derivatives **30** and **56**. The acetamide derivatives **24** exhibited no antitrypanosomal properties against *T. cruzi* parasites. By proliferation assays for *T. b. brucei* parasites the acetic acid ester derivatives **23b** and **23c**, the acetamide derivatives **24b**, **24h**, **24k** and the pyrrole derivative **56** were determined to be micromolar inhibitors. The benzyl amide derivative **24b** is the most potent *T. b. brucei* proliferation inhibitor in the context of this thesis with an EC_{50} value of 40 nM (Figure 4). The measurements of cytotoxicity against mouse macrophages showed a low cytotoxicity for **24b** about 19% at 30 μ M. In enzyme assays on *TbTryS* compound **24b** exhibited an inhibitory activity of 45% at 30 μ M. This illustrates that there could be another addressed target inside the *T. b. brucei* parasites. In contrast to *LtTryS* none of the tested compounds inhibited the *TbTryS* more than 55% at 30 μ M.

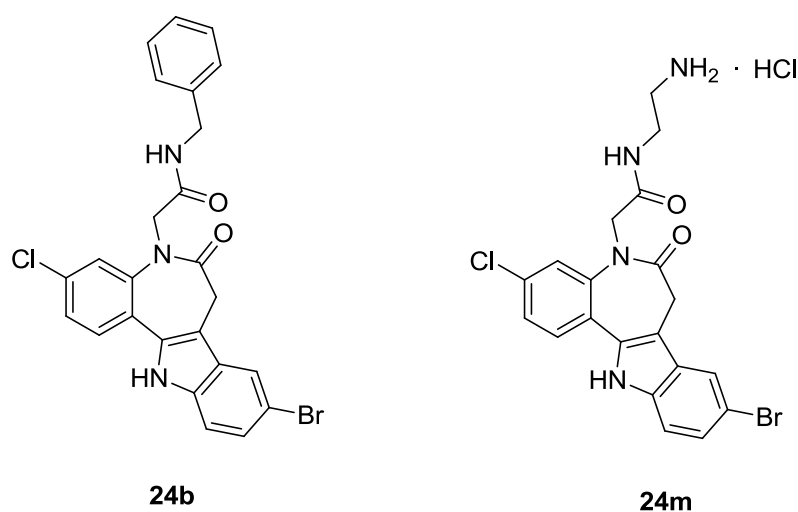


Figure 4: The most potent inhibitors synthesized in this thesis; **24b**: *T. b. brucei* proliferation: EC_{50} = 40 nM, *TbTryS*-activity 45% at 30 μ M; **24m**: *LtTryS* inhibition: IC_{50} = 269 nM.

The inhibitory activities of the paullone- N^6 -acetamides **24c**, **24f**, **24k** and **24m** against *LtTryS* are in submicromolar ranges. Compound **24m** is the most potent *LtTryS* inhibitor with an IC_{50} value of 269 nM.

In the context of this work, submicromolar *L*/TryS inhibitors were synthesized. The acetamide derivative **24m** represents the most active paullone ever tested against the leishmania enzyme ¹²⁴. This compound represents a good lead structure for further derivatisations to create inhibitors for the TryS of *Leishmania* and *Trypanosoma*.

7 Experimentelle Methoden

7.1 Analytische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC)

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden durchgeführt auf DC-Mikrokarten Polygram[®] Sil G/UV₂₅₄, 40 x 80 mm, von der Firma Macherey-Nagel aus Düren. Detektiert wurde unter UV-Licht bei 254 nm und 366 nm. Die vorwiegend verwendeten Fließmittel waren Gemische aus Toluol/Ethanol 4:1 oder Petrolether/Essigsäureethylester 1:1.

Elementaranalyse (CHN)

Die Elementaranalysen (CHN-Analysen) wurden in der analytischen Abteilung des Instituts für Medizinischen und Pharmazeutischen Chemie der TU Braunschweig durchgeführt. Verwendet wurde ein CE Instruments FlashEA[®] 1112 Elemental Analyzer der Firma Thermo Quest aus San Jose, CA, USA. Die Angaben im experimentellen Teil sind die berechneten (ber.) und gefundenen (gef.) Werte in Prozent.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für isokratische Messungen wurde die im Folgenden beschriebene HPLC-Anlage verwendet: LaChrom Elite[®]: Pump L-2130, Autosampler L-2200, Column Oven L-2300, Diode Array Detector L-2450, OrganizerBox L-2000, Trennsäule Merck LiChroCART[®] 125-4, LiChropher[®] 100 RP-18, 5 µm, Fa. Merck/Hitachi, Darmstadt. Bei der Probenvorbereitung wurde 1 mg der jeweiligen Probe in 500 µL DMSO HPLC-Qualität gelöst. Aus dieser Lösung wurden 200 µL mit 500 µL DMSO HPLC-Qualität verdünnt und durch einen Acrodisc[®] MHP 13 µm Filter filtriert. Angestrebt wurde ein Absorptionsmaximum des Hauptpeaks im Bereich von 300-800 mAU. Zu

konzentrierte Lösungen wurden gegebenenfalls weiter verdünnt. Das Injektionsvolumen betrug 10 µL, die Flussrate wurde auf 1 mL/min eingestellt. Die Gesamtlaufzeit einer Messung belief sich auf 15 min. Die angestrebte Gesamtretentionszeit (t_N) betrug 4-8 min, t_M stellt die Totzeit dar. Als Elutionsmittel wurden Gemische aus Acetonitril (HPLC grade)/H₂O (bidest.) bzw Acetonitril (HPLC grade)/Puffer verwendet. Die Zusammensetzung ist für die jeweilige Verbindung angegeben. Für den Puffer wurden 20 mL Triethylamin, 980 mL Wasser bidest. und 242 mg Natriumhydroxidgranulat gemischt und die Lösung durch Zugabe von konzentrierter Schwefelsäure auf pH = 2.0 eingestellt. Detektiert wurde mittels DAD bei 254 nm und 280 nm. Die Auswertung geschah über die Integration der Peakflächen und Auswertung mittels 100%-Methode. Der Integrationsausschluss wurde bei 1.55 min festgesetzt, der Threshold bei 1000 AU. Die Absorptionsmaxima (λ_{max}) wurden aus den UV-Spektren des DAD entnommen. Die verwendete Software heißt EZ Chrom Elite Client/Server Version 3.1.3.

Für Gradientenmessungen wurde an folgender Anlage gemessen: LaChrom Elite®: Pump L-2130, Autosampler L-2200, UV-Detektor L-2400, OrganizerBox L-2000, Trennsäule Merck LiChroCART® 125-4, LiChropher® 100 RP-18, 5 µm, Fa. Merck/Hitachi, Darmstadt. Die verwendete Messmethode ist jeweils beschrieben, die Auswertung verlief analog zu der von isokratischen Messungen. Eingesetzt wurde Acetonitril HPLC Gradient grade.

Infrarotspektroskopie (IR)

Die Infrarotspektroskopie (IR) wurde in der analytischen Abteilung des Instituts für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig durchgeführt. Gemessen wurden Kaliumbromidpresslinge der festen Substanz in einem Thermo Nicolet FT-IR 200 der Firma Thermo Nicolet aus Madison, WI, USA.

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Messungen der Kernresonanzspektroskopie (NMR) wurden in der NMR-Abteilung der Chemischen Institute der TU Braunschweig durchgeführt. Es wurden Spektrometer der Firma Bruker vom Typ Avance DRX-400 (¹H-NMR-Messung: 400 MHz, ¹³C-NMR-Messung: 100.6 MHz) und Avance II-600 (¹H-NMR-Messung: 600 MHz, ¹³C-NMR-Messung: 150.9 MHz) verwendet. Es wurde im jeweils angegebenen Lösungsmittel bei 28 °C gemessen. Als Lösungsmittel wurden

hauptsächlich d_6 -DMSO, $CDCl_3$ und D_2O eingesetzt, als interner Standard Tetramethylsilan. Die Angaben der chemischen Verschiebungen sind in ppm nach der δ_{TMS} -Skala aufgeführt. Die Ermittlung der Protonenverhältnisse im 1H -NMR erfolgte mittels Integration mit Hilfe der Software MestReNova. Die auftretenden Signalmultiplizitäten sind wie folgt abgekürzt: *s* (Singulett), *d* (Dublett), *dd* (Doppeldublett), *t* (Triplett), *q* (Quartett), *m* (Multiplett), *b* (breites Signal), *bs* (breites Singulett), *bd* (breites Dublett).

^{13}C -NMR-Spektren wurden 1H -breitbandentkoppelt aufgenommen. Auf eine Überlagerung der Signale von 2 bzw. 3 Kohlenstoff-Atomen weist der Zusatz (2C) bzw. (3C) hin. ^{13}C -DEPT135-Messungen ermöglichten die Zuordnung der Signale zu primären (prim. C), sekundären (sek. C), tertiären (tert. C) und quartären Kohlenstoffen (quart. C).

Massenspektrometrie (MS)

Die Massenspektren wurde an den Chemischen Instituten der TU Braunschweig an einem Finnigan-Mat 95 der Firma Thermo Finnigan Mat aus Bremen aufgenommen. Durchgeführt wurden Elektronenstoßionisationen (EI)-MS mit einer Ionisationsenergie von 70 eV. Die detektierten Ionenmassen sind in m/z (Masse zu Ladung) angegeben, die Intensitäten bezogen auf die Basislinie in Prozent. Zur Messung hochaufgelöster Massenspektren (HRMS) wurde Perfluorkerosin als interner Standard eingesetzt. Angegeben sind die berechneten (ber.) und gefundenen (gef.) Werte.

Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden an einem Electrothermal IA 9100 der Firma Barnstedt International aus Southend-on-Sea, Essex, Großbritannien gemessen. Schmelzbereiche wurden mit Smp. gekennzeichnet, der Beginn einer Zersetzung mit Zers..

7.2 Chemikalien

Ausgangsstoffe und Reagenzien wurden über Acros Organics (Geel, Belgien) oder Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen. γ -Bromacetessigsäureethylester wurde bei Ark Pharm, Inc. (Libertyville, IL, USA) erworben. DMF wurde grundsätzlich in Uvasol-Qualität verwendet. Sofern nicht anders angegeben, wurden Lösungsmittel ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt. Getrocknete Lösungsmittel wurden mittels leicht variierten publizierten Methoden¹²⁵ hergestellt und über Molsieb 4 Å gelagert.

Dichlormethan und Tetrahydrofuran

Dichlormethan bzw. Tetrahydrofuran (je 1.0 L) wird über Nacht mit Kaliumhydroxid (15.0 g) vorgetrocknet. Nach dem Abdekantieren des vorgetrockneten Lösungsmittels wird dieses mit Calciumhydrid (2.0 g) versehen und für 5 h unter Feuchtigkeitsausschluss refluxiert. Anschließend wird das Lösungsmittel mittels Destillation vom Bodensatz getrennt und über Molsieb 4 Å gelagert.

Tetrachlorkohlenstoff

Tetrachlorkohlenstoff (1.0 L) wird mittels azeotroper Destillation vorgetrocknet. Anschließend wird Phosphorpentoxid (5.0 g) zugegeben und für 5 h unter Feuchtigkeitsausschluss refluxiert. Das getrocknete Lösungsmittel wird destillativ vom Bodensatz getrennt und über Molsieb 4 Å gelagert.

Toluol

Toluol (1.0 L) wird mittels azeotroper Destillation vorgetrocknet. Anschließend wird Calciumhydrid (2.0 g) zugegeben und für 5 h unter Feuchtigkeitsausschluss refluxiert. Das getrocknete Lösungsmittel wird destillativ vom Bodensatz getrennt und über Molsieb 4 Å gelagert.

7.3 Synthesen und analytische Daten

AAV 1: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese von 7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*]-[1]benzazepin-6(5*H*)-onen

8-Chlor-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**33**, 210 mg, 1.00 mmol) wird mit dem entsprechenden Phenylhydrazin (1.30 mmol) in Eisessig (10 mL) suspendiert und auf 70 °C geheizt. Wird das entsprechende Phenylhydrazin-Hydrochlorid verwendet, muss zusätzlich wasserfreies Natriumacetat (1.30 mmol) zu dem Ansatz hinzugegeben werden. Nach 1 h Rühren bei 70 °C wird konzentrierte Schwefelsäure (100 µL) hinzugegeben und 1 h weiter bei 70 °C gerührt. Anschließend wird auf Raumtemperatur abgekühlt und der Ansatz auf eine 5%ige wässrige Natriumacetatlösung (20 mL) gegeben. Der über Nacht im Kühlschrank ausgefallene Niederschlag wird abgesaugt, mit entionisiertem Wasser gewaschen und aus dem jeweils angegebenen Lösungsmittel umkristallisiert.

AAV 2: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese *N*⁶-substituierter 9-Brom-3-chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one

9-Brom-3-chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**20a**, 362mg, 1.00 mmol) wird unter Stickstoffatmosphäre in getrocknetem Tetrahydrofuran (25 mL) gelöst. Anschließend wird Kalium-*tert*-butylat (126 mg, 1.12 mmol) hinzugegeben und die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur gerührt. Nach 1 h Rühren wird das entsprechende Alkylbromid (1.10-1.90 mmol) hinzugegeben und über Nacht gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Der entstandene Rückstand wird in Dichlormethan (100 mL) aufgenommen und mit Wasser gewaschen (100 mL). Anschließend wird die organische Phase unter vermindertem Druck abdestilliert. Der erhaltene Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt bzw. aus dem jeweils angegebenen Lösungsmittel umkristallisiert.

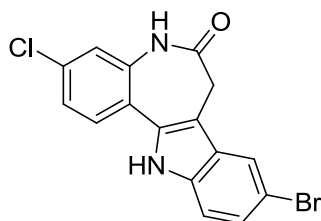
AAV 3: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese von Paullon-*N*⁵-acetamiden

Methode A:

Zu einer eisgekühlten Lösung aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**39**, 210 mg, 500 µmol) in DMF (1 mL) werden unter Stickstoffatmosphäre DIPEA (370 µL), PyBOP (312 mg, 600 µmol) und das entsprechende Amin (600 µmol) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wird mit Argon überschichtet und anschließend im geschlossenen Gefäß über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung in Essigsäureethylester (100 mL) und 0.1 molarer wässriger Salzsäure (100 mL) aufgenommen. Die Phasen werden voneinander getrennt. Die organische Phase wird mit entionisiertem Wasser, 0.1 molarer wässriger Natriumhydroxidlösung und nochmals mit entionisiertem Wasser (jeweils 50 mL) gewaschen. Anschließend wird die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Danach wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abdestilliert. Der entstandene Rückstand wird aus dem jeweils angegebenen Lösungsmittel umkristallisiert.

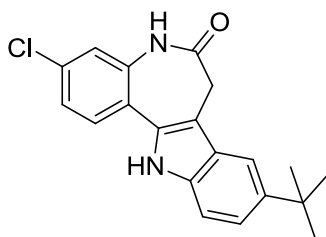
Methode B:

Zu einer eisgekühlten Lösung aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**39**, 210 mg, 500 µmol) in DMF (1 mL) werden unter Stickstoffatmosphäre DIPEA (370 µL), PyBOP (312 mg, 600 µmol) und das entsprechende Amin (600 µmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wird mit Argon überschichtet und anschließend im geschlossenen Gefäß über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung in Essigsäureethylester (100 mL) und 0.1 molarer wässriger Salzsäure (100 mL) aufgenommen. Da die Phasen schlecht trennbar sind, wird der Ansatz am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck von dem organischen Lösungsmittel befreit. Der Niederschlag wird von der übrigen wässrigen Phase abfiltriert und mit viel entionisiertem Wasser gewaschen. Der Filterkuchen wird aus dem jeweils angegebenen Lösungsmittel umkristallisiert.

3-Chlor-9-brom-7,12-dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (20a)

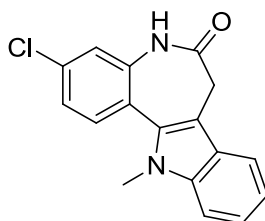
Nach AAV 1 unter Einsatz von 8-Chlor-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**33**, 219 mg, 1.05 mmol), 4-Bromphenylhydrazin-Hydrochlorid (312 mg, 1.40 mmol) und wasserfreiem Natriumacetat (115 mg, 1.40 mmol). Es wurde aus Ethanol umkristallisiert. Erhalten wurden 311 mg oranges Pulver (82% Ausbeute).

Zers.: ab 348 °C; IR (KBr): 3218 cm⁻¹ (NH), 1647 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (600 MHz, d₆-DMSO): δ (ppm) = 11.88 (s, 1H, Indol-NH), 10.25 (s, 1H, Lactam-NH), 7.94 (d, 1H, ⁴J_{H,H} = 1.9 Hz, *H*_{arom}), 7.75 (d, 1H, ³J_{H,H} = 8.5 Hz, *H*_{arom}), 7.40 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 8.6 Hz, *H*_{arom}), 7.37 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, ⁴J_{H,H} = 2.2 Hz, *H*_{arom}), 7.31 (d, 1H, ⁴J_{H,H} = 2.2 Hz, *H*_{arom}), 7.29 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 8.6 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.9 Hz, *H*_{arom}), 3.56 (s, 2H, -CH₂); ¹³C-NMR (150.9 MHz, d₆-DMSO): δ (ppm) = 31.2 (Azepin-CH₂); 113.4, 120.5, 121.5, 123.5, 124.8, 128.5 (tert. C); 107.3, 111.8, 121.1, 128.1, 132.3, 132.9, 136.0, 136.7, 171.3 (C=O) (quart. C); CHN: ber. C 53.14, H 2.79, N 7.75, gef. C 53.14, H 2.76, N 7.35; C₁₆H₁₀BrClN₂O (361.63); MS (EI): m/z (%) = 362 ([M]⁺, 100), 333 ([M-29 (-CHO)]⁺, 74); HPLC (isokrat.): 98.8% bei 254 nm, 98.0% bei 280 nm, t_N = 5.90 min, t_M (DMSO) = 1.07 min (ACN/H₂O 50:50); λ_{max}: 233 nm, 321 nm, 390 nm; HPLC (grad.): 98.7% bei 254 nm, t_N = 9.89 min, t_M (DMSO) = 1.07 min (Zeit: ACN/H₂O; 0 min: 10/90; 10 min: 70/30; 10.5 min: 90/10; 22 min: 90/10).

9-*tert*-Butyl-3-chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (20b)

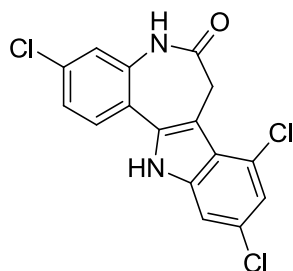
Gearbeitet wurde nach AAV 1 unter Einsatz von 8-Chlor-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**33**, 204 mg, 973 μ mol), 4-*tert*-Butylphenylhydrazin-Hydrochlorid (261 mg, 1.30 mmol) und wasserfreiem Natriumacetat (109 mg, 1.30 mmol). Es wurde aus Ethanol umkristallisiert, erhalten wurden 140 mg gelbes Pulver (49% Ausbeute).

Zers.: ab 336 °C; IR (KBr): 3254 cm^{-1} (NH), 1650 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (600 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = 11.51 (s, 1H, Indol-NH), 10.22 (s, 1H, Lactam-NH), 7.73 (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz, H_{arom}), 7.61 (d, 1H, $^4J_{\text{H,H}} = 1.8$ Hz, H_{arom}), 7.36 (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, H_{arom}), 7.35 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.2$ Hz, H_{arom}), 7.30 (d, 1H, $^4J_{\text{H,H}} = 2.2$ Hz, H_{arom}), 7.28 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.9$ Hz, H_{arom}), 3.54 (s, 2H, -CH₂), 1.36 (s, 9H, *tert*-Butyl); ^{13}C -NMR (150.9 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = 31.7 (3C, -CH₃); 31.5 (Azepin-CH₂); 111.0, 113.5, 120.7, 121.4, 123.4, 128.2 (tert. C); 34.3, 107.9, 121.9, 126.1, 131.4, 131.7, 135.7, 136.2, 141.6, 171.5 (quart. C); CHN: ber. C 70.90, H 5.65, N 8.27, gef. C 70.23, H 5.78, N 8.11; C₂₀H₁₉ClN₂O (338.84); MS (EI): m/z (%) = 338 ([M]⁺, 59), 323 ([M-15 (-CH₃)]⁺, 100), 309 ([M-29 (-CHO)]⁺, 9); HRMS (EI): m/z [M]⁺ ber. 338.11804, gef. 338.11755; HPLC (isokrat.): 99.5% bei 254 nm, 98.7% bei 280 nm, $t_{\text{N}} = 5.04$ min, t_{M} (DMSO) = 1.07 min (ACN/H₂O 60:40); λ_{max} : 235 nm, 312 nm, 388 nm.

3-Chlor-12-methyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**20c**)

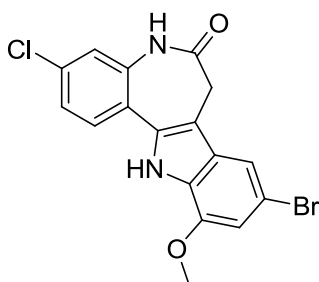
Gearbeitet wurde nach AAV 1 unter Einsatz von 8-Chlor-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**33**, 410 mg, 1.95 mmol) und 1-Methyl-1-phenylhydrazin (303 mg, 2.48 mmol) in Eisessig (20 mL). Es wurde aus Ethanol umkristallisiert. Erhalten wurden 140 mg gelbes Pulver (61% Ausbeute).

Zers.: ab 345 °C; IR (KBr): 3180 cm⁻¹ (NH), 1672 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (600 MHz, *d*₆-DMSO): δ (ppm) = 10.18 (s, 1H, Lactam-NH), 7.77 (d, 1H, ³*J*_{H,H} = 9.0 Hz, *H*_{arom}), 7.63-7.70 (m, 1H, *H*_{arom}), 7.54-7.58 (m, 1H, *H*_{arom}), 7.39-7.35 (m, 2H, *H*_{arom}), 7.28 (dd, 1H, ³*J*_{H,H} = 8.2 Hz, 7.0 Hz, *H*_{arom}), 7.15 (dd, 1H, ³*J*_{H,H} = 7.9 Hz, 7.0 Hz, *H*_{arom}), 3.83 (s, 3H, Indol-N-CH₃), 3.30 (bs, 2H, -CH₂ (von H₂O überlagert)); ¹³C-NMR (150.9 MHz, *d*₆-DMSO): δ (ppm) = 31.4 (-CH₃); 31.6 (Azepin-CH₂); 110.3, 118.0, 119.6, 122.0, 122.5, 123.2, 130.3 (tert. C); 109.9, 120.7, 125.1, 132.1, 132.6, 137.5, 138.9, 172.4 (C=O) (quart. C); CHN: ber. C 68.81, H 4.42, N 9.44, gef. C 68.55, H 4.20, N 9.06; C₁₇H₁₃ClN₂O (296.76); MS (EI): *m/z* (%) = 296 ([M]⁺, 63), 281 ([M-15 (-CH₃)]⁺, 57), 267 ([M-29 (-CHO)]⁺, 100); HPLC (isokrat.): 99.7% bei 254 nm, 99.5% bei 280 nm, *t*_N = 5.86 min, *t*_M (DMSO) = 1.07 min (ACN/H₂O 50:50); λ_{max}: 231 nm, 313 nm, 384 nm; HPLC (grad.): 96.1% bei 254 nm, *t*_N = 11.86 min, *t*_M (DMSO) = 1.07 min (Zeit: ACN/H₂O; 0 min: 10/90; 10 min: 70/30; 10.5 min: 90/10; 22 min: 90/10).

3,8,10-Trichlor-7,12-dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (**20d**)

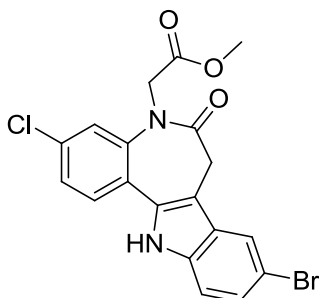
Gearbeitet wurde nach AAV 1 unter Einsatz von 8-Chlor-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**33**, 400 mg, 1.90 mmol), 3,5-Dichlorphenylhydrazin-Hydrochlorid (530 mg, 2.48 mmol) und wasserfreiem Natriumacetat (208 mg, 2.53 mmol) in Eisessig (20 mL). Es wurde aus Ethanol umkristallisiert, erhalten wurden 111 mg gelbes Pulver (17% Ausbeute).

Zers.: ab 379 °C; IR (KBr): 3303 cm⁻¹ (NH), 1652 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (400 MHz, d₆-DMSO): δ (ppm) = 12.24 (s, 1H, Indol-NH), 10.32 (s, 1H, Lactam-NH), 7.74 (d, 1H, ³J_{H,H} = 8.5 Hz, *H*_{arom}), 7.46 (d, 1H, ⁴J_{H,H} = 1.8 Hz, *H*_{arom}), 7.40 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 8.5 Hz, ⁴J_{H,H} = 2.2 Hz, *H*_{arom}), 7.32 (d, 1H, ⁴J_{H,H} = 2.1 Hz, *H*_{arom}), 7.20 (d, 1H, ⁴J_{H,H} = 1.7 Hz, *H*_{arom}), 3.84 (s, 2H, Azepin-CH₂); ¹³C-NMR (100.6 MHz, d₆-DMSO): δ (ppm) = 31.7 (Azepin-CH₂); 110.6, 120.3, 121.4, 123.6, 129.0 (tert. C); 107.2, 120.7, 121.5, 124.9, 126.4, 132.9, 134.5, 137.1, 138.6, 171.4 (quart. C); CHN: ber. C 54.65, H 2.58, N 7.97, gef. C 54.28, H 2.53, N 7.68; C₁₆H₉Cl₃N₂O (351.62); MS (EI): m/z (%) = 350 ([M-H]⁺, 100), 321 ([M-29 (-CHO)]⁺, 94); HPLC (isokrat.): 99.8% bei 254 nm, 99.7% bei 280 nm, t_N = 4.41 min, t_M (DMSO) = 1.07 min (ACN/H₂O 60:40); λ_{max}: 235 nm, 322 nm, 394 nm.

9-Brom-3-chlor-11-methoxy-7,12-dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (**20e**)

Gearbeitet wurde nach AAV 1 unter Einsatz von 8-Chlor-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**33**, 420 mg, 2.00 mmol), (4-Brom-2-methoxyphenyl)hydrazin-Hydrochlorid (641 mg, 2.53 mmol) und wasserfreiem Natriumacetat (224 mg, 2.73 mmol) in Eisessig (20 mL). Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Laufmittel 9:1 Toluol/Ethanol bis 1:1 Toluol/Ethanol) erfolgten Umkristallisationen aus Toluol/Ethanol 1:1, Methanol und Ethanol 96%. Es konnten so 63.9 mg Produkt erhalten werden (8% Ausbeute).

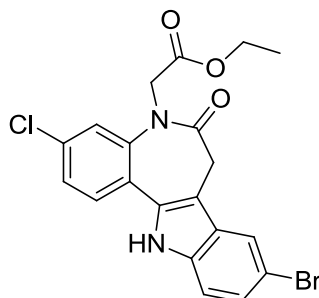
Zers.: ab 345 °C; IR (KBr): 3376 cm⁻¹ (NH), 1650 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO): δ (ppm) = 11.89 (s, 1H, Indol-NH), 10.18 (s, 1H, Lactam-NH), 7.75 (d, 1H, ³*J*_{H,H} = 8.4 Hz, *H*_{arom}), 7.52 (d, 1H, ⁴*J*_{H,H} = 1.5 Hz, *H*_{arom}), 7.30 (m, 2H, *H*_{arom}), 6.89 (d, 1H, ⁴*J*_{H,H} = 1.6 Hz, *H*_{arom}), 3.98 (s, 3H, -OCH₃), 3.50 (s, 2H, Azepin-CH₂); ¹³C-NMR (100.6 MHz, *d*₆-DMSO): δ (ppm) = 55.6 (-OCH₃); 31.4 (Azepin-CH₂); 106.1, 113.2, 121.4, 123.2, 129.3 (tert. C); 108.2, 111.8, 121.3, 126.5, 128.6, 132.2, 132.5, 136.7, 146.7, 171.5 (quart. C); C₁₇H₁₂BrClN₂O₂ (391.65); MS (EI): *m/z* (%) = 392 ([M]⁺, 100), 363 ([M-29 (-CHO)]⁺, 42); HRMS (EI): *m/z* [M-H]⁺ ber. 388.96869, gef. 388.96884; HPLC (isokrat.): 88.3% bei 254 nm, 92.3% bei 280 nm, *t*_N = 6.09 min, *t*_M (DMSO) = 1.07 min (ACN/H₂O 50:50); λ_{max}: 235 nm, 260 nm, 313 nm.

Methyl-2-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)acetat (**23a**)

Gearbeitet wurde nach AAV 2 unter Einsatz von 9-Brom-3-chlor-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**20a**, 325 mg, 898 μ mol), Kalium-*tert*-butylat (113 mg, 1.00 mmol) und Bromessigsäuremethylester (262 mg, 1.71 mmol) in getrocknetem Tetrahydrofuran (25 mL). Es wurde aus Ethanol umkristallisiert. Erhalten wurden 161 mg gelbes Pulver (41% Ausbeute).

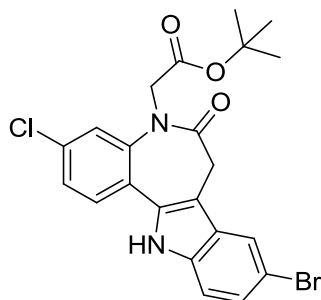
Zers.: 300-301 °C; IR (KBr): 3308 cm^{-1} (NH), 1643 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = 12.01 (s, 1H, Indol-NH), 7.96 (d, 1H, $^4J_{\text{H,H}} = 1.8$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.74 (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.60 (d, 1H, $^4J_{\text{H,H}} = 2.0$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.50 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.0$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.43 (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.30 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.9$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 4.48 (s, 2H, -N⁵-CH₂), 3.63 (s, 3H, -OCH₃), 3.98 und 3.14 (bs, 2H, Azepin-CH₂ (Aufnahme des Spektrums nahe der Koaleszenztemperatur; Übergang zwischen einem s zu zwei d erscheint als zwei bs)); ^{13}C -NMR (100.6 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = 51.9 (-OCH₃); 30.9 (Azepin-CH₂), 52.2 (-N⁵-CH₂); 113.6, 120.7, 123.8, 124.9, 125.4, 128.6 (tert. C); 109.1, 111.9, 124.2, 127.8, 132.6, 132.9, 136.0, 140.4, 169.8, 170.4 (quart. C); CHN: ber. C 52.62, H 3.25, N 6.46, gef. C 52.64, H 3.02, N 6.38; C₁₉H₁₄BrClN₂O₃ (433.68); MS (EI): m/z (%) = 434 ([M]⁺, 100), 405 ([M-29 (-CHO)]⁺, 29), 361 ([M-73 (-CH₂COOCH₃)]⁺, 79); HPLC (isokrat.): 98.2% bei 254 nm, 97.2% bei 280 nm, $t_{\text{N}} = 4.00$ min, t_{M} (DMSO) = 1.07 min (ACN/H₂O 60:40); λ_{max} : 234 nm, 317 nm, 384 nm; HPLC (grad.): 94.8% bei 254 nm, $t_{\text{N}} = 11.49$ min, t_{M} (DMSO) = 1.07 min (Zeit: ACN/H₂O; 0 min: 10/90; 10 min: 70/30; 10.5 min: 90/10; 22 min: 90/10).

Ethyl-2-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)acetat (**23b**)



Gearbeitet wurde nach AAV 2 unter Einsatz von 9-Brom-3-chlor-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**20a**, 649 mg, 1.80 mmol), Kalium-*tert*-butylat (243 mg, 2.17 mmol) und Bromessigsäureethylester (534 mg, 3.20 mmol) in getrocknetem Tetrahydrofuran (50 mL). Es wurde aus Ethanol umkristallisiert. Erhalten wurden 380 mg farbloses Pulver (47% Ausbeute).

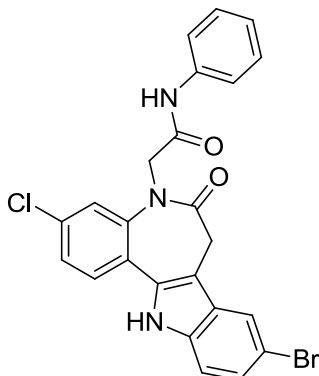
Smp.: 289-294 °C; IR (KBr): 3317 cm⁻¹ (NH), 1741 cm⁻¹ (C=O), 1652 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO): δ (ppm) = 12.01 (s, 1H, Indol-NH), 7.96 (d, 1H, ⁴*J*_{H,H} = 1.8 Hz, *H*_{arom}), 7.74 (d, 1H, ³*J*_{H,H} = 8.4 Hz, *H*_{arom}), 7.61 (d, 1H, ⁴*J*_{H,H} = 2.0 Hz, *H*_{arom}), 7.50 (dd, 1H, ³*J*_{H,H} = 8.4 Hz, ⁴*J*_{H,H} = 2.1 Hz, *H*_{arom}), 7.43 (d, 1H, ³*J*_{H,H} = 8.6 Hz, *H*_{arom}), 7.30 (dd, 1H, ³*J*_{H,H} = 8.6 Hz, ⁴*J*_{H,H} = 1.9 Hz, *H*_{arom}), 4.49 (s, 2H, -N⁵-CH₂), 4.05 (q, 2H, ³*J*_{H,H} = 7.1 Hz, -CH₂), 3.98 und 3.14 (bs, 2H, Azepin-CH₂ (Aufnahme des Spektrums nahe der Koaleszenztemperatur; Übergang zwischen einem s zu zwei *d* erscheint als zwei bs)), 1.08 (t, 3H, ³*J*_{H,H} = 7.1 Hz, -CH₃); ¹³C-NMR (100.6 MHz, *d*₆-DMSO): δ (ppm) = 13.8 (-CH₃); 30.8 (Azepin-CH₂), 52.2 (-N⁵-CH₂), 60.6 (Ethoxy-CH₂); 113.5, 120.6, 123.9, 124.8, 125.4, 128.6 (tert. C); 109.1, 111.8, 124.3, 127.8, 132.6, 133.0, 136.0, 140.4, 169.2, 170.3 (quart. C); CHN: ber. C 53.65, H 3.60, N 6.26, gef. C 53.66, H 3.55, N 6.07; C₂₀H₁₆BrClN₂O₃ (447.71); MS (EI): *m/z* (%) = 448 ([M]⁺, 100), 419 ([M-29 (-CHO)]⁺, 12), 361 ([M-87 (-CH₂COOC₂H₅)]⁺, 80); HPLC (isokrat.): 98.0% bei 254 nm, 97.7% bei 280 nm, *t*_N = 5.16 min, *t*_M (DMSO) = 1.07 min (ACN/H₂O 60:40), λ_{max}: 234 nm, 318 nm, 380 nm.

tert-Butyl-2-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)acetat (**23c**)

Gearbeitet wurde nach AAV 2 unter Einsatz von 9-Brom-3-chlor-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**20a**, 610 mg, 1.68 mmol), Kalium-*tert*-butylat (224 mg, 1.99 mmol) und Bromessigsäure-*tert*-butylester (390 mg, 1.99 mmol) in getrocknetem Tetrahydrofuran (50 mL). Es wurde aus Ethanol umkristallisiert. Erhalten wurden 446 mg gelbes Pulver (56% Ausbeute).

Smp.: 278-281 °C; IR (KBr): 3333 cm⁻¹ (NH), 1736 cm⁻¹ (C=O), 1653 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO): δ (ppm) = 12.00 (s, 1H, Indol-NH), 7.95 (d, 1H, ⁴*J*_{H,H} = 1.9 Hz, *H*_{arom.}), 7.74 (d, 1H, ³*J*_{H,H} = 8.4 Hz, *H*_{arom.}), 7.59 (d, 1H, ⁴*J*_{H,H} = 2.1 Hz, *H*_{arom.}), 7.50 (dd, 1H, ³*J*_{H,H} = 8.4 Hz, ⁴*J*_{H,H} = 2.1 Hz, *H*_{arom.}), 7.42 (d, 1H, ³*J*_{H,H} = 8.6 Hz, *H*_{arom.}), 7.30 (dd, 1H, ³*J*_{H,H} = 8.6 Hz, ⁴*J*_{H,H} = 1.9 Hz, *H*_{arom.}), 4.42 (s, 2H, -N⁵-CH₂), 3.97 und 3.09 (bs, 2H, Azepin-CH₂ (Aufnahme des Spektrums nahe der Koaleszenztemperatur; Übergang zwischen einem s zu zwei d erscheint als zwei bs)), 1.25 (s, 9H, *tert*-Butyl); ¹³C-NMR (100.6 MHz, *d*₆-DMSO): δ (ppm) = 27.4 (3C, *tert*-Butyl); 30.9 (Azepin-CH₂), 52.7 (-N⁵-CH₂); 113.6, 120.7, 123.9, 124.9, 125.3, 128.7 (tert. C); 80.9, 109.2, 111.8, 124.3, 127.8, 132.5, 133.0, 136.0, 140.3, 168.1, 170.2 (quart. C); CHN: ber. C 55.54, H 4.24, N 5.89, gef. C 55.93, H 4.33, N 5.59; C₂₂H₂₀BrClN₂O₃ (475.76); MS (EI): *m/z* (%) = 476 ([M]⁺, 74), 420 ([M-56 (-C₄H₈)]⁺, 100), 361 ([M-115 (-C₆H₁₁O₂)]⁺, 79); HPLC (isokrat.): 99.0% bei 254 nm, 99.1% bei 280 nm, *t*_N = 3.96 min, *t*_M (DMSO) = 1.07 min (ACN/H₂O 50:50); λ_{max}: 233 nm, 319 nm, 385 nm; HPLC (grad.): 95.2% bei 254 nm, *t*_N = 13.40 min, *t*_M (DMSO) = 1.07 min (Zeit: ACN/H₂O; 0 min: 10/90; 10 min: 70/30; 10.5 min: 90/10; 22 min: 90/10).

2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-phenylacetamid (**24a**)

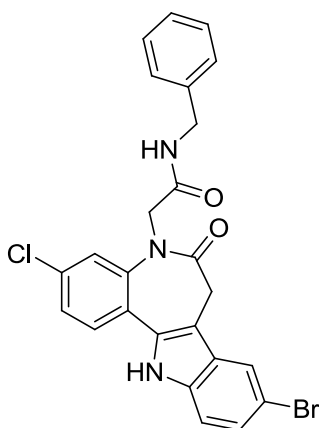


Gearbeitet wurde nach AAV 3 Methode B unter Verwendung von 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**39**, 218 mg, 519 μmol), DMF (1 mL), DIPEA (370 μL , 2.12 mmol), PyBOP (279 mg, 536 μmol) und Anilin (54.8 μL , 598 μmol). Umkristallisiert wurde aus Ethanol. Erhalten wurden 157 mg farbloses Pulver (61% Ausbeute).

Zers.: ab 280 °C; IR (KBr): 3311 cm^{-1} (NH), 1672 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = 12.03 (s, 1H, Indol-NH), 10.22 (s, 1H, -NH), 7.98 (d, 1H, $^4J_{\text{H,H}} = 2.0$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.76-7.71 (m, 2H, $H_{\text{arom.}}$), 7.63-7.58 (m, 2H, $H_{\text{arom.}}$), 7.50 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.44 (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.36-7.28 (m, 3H, $H_{\text{arom.}}$), 7.10-7.02 (m, 1H, $H_{\text{arom.}}$), 4.49 (b, 2H, -N⁵-CH₂ (Aufnahme des Spektrums nahe der Koaleszenztemperatur; Übergang zwischen einem s zu zwei d erscheint als ein bs)), 4.00 und 3.14 (bs, 2H, Azepin-CH₂ (Aufnahme des Spektrums nahe der Koaleszenztemperatur; Übergang zwischen einem s zu zwei d erscheint als zwei bs)); ^{13}C -NMR (100.6 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = 31.1 (Azepin-CH₂), 54.2 (-N⁵-CH₂); 113.6, 119.0 (2C), 120.7, 123.3, 124.2, 124.9, 125.2, 128.6, 128.8 (2C) (tert. C); 109.3, 111.9, 124.0, 127.8, 132.5, 133.0, 136.0, 138.8, 141.0, 167.2, 170.3 (quart. C); CHN: ber. C 58.26, H 3.46, N 8.49, gef. C 58.08, H 3.58, N 8.30; C₂₄H₁₇BrClN₃O₂ (494.77); MS (EI): m/z (%) = 495 ([M]⁺, 42), 402 ([M-93 (-C₆H₇N)]⁺, 100); HRMS (EI): m/z [M]⁺ ber. 495.01669, gef. 495.01659; HPLC (isokrat.): 97.2% bei 254 nm, 97.3% bei 280 nm, t_N = 4.47 min, t_M (DMSO) = 1.07 min (ACN/H₂O 60:40); λ_{max} : 255 nm, 316 nm, 393 nm; HPLC (grad.): 98.2% bei 254 nm,

$t_N = 12.94$ min, t_M (DMSO) = 1.07 min (Zeit: ACN/H₂O; 0 min: 10/90; 10 min: 70/30; 10.5 min: 90/10; 22 min: 90/10).

N-Benzyl-2-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-b]indol-5-yl)acetamid (**24b**)

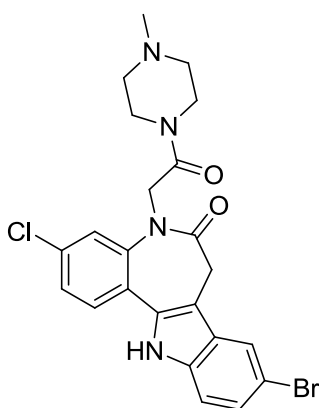


Gearbeitet wurde nach AAV 3 Methode A unter Verwendung von 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-b]indol-5-yl)essigsäure (**39**, 202 mg, 481 μ mol), DMF (1 mL), DIPEA (370 μ L, 2.12 mmol), PyBOP (283 mg, 544 μ mol) und Benzylamin (65.4 μ L, 601 μ mol). Umkristallisiert wurde aus einem 1:1 Gemisch aus Tetrahydrofuran und Toluol. Erhalten wurden 128 mg farblores Pulver (53% Ausbeute).

Zers.: ab 337 °C; IR (KBr): 3316 cm^{-1} (NH), 1663 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = 11.99 (s, 1H, Indol-NH), 8.66 (t, 1H, $^3J_{H,H} = 6.0$ Hz, -NH), 7.97 (d, 1H, $^4J_{H,H} = 2.0$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.71 (m, 2H, $H_{\text{arom.}}$), 7.49 (dd, 1H, $^3J_{H,H} = 8.4$ Hz, $^4J_{H,H} = 2.1$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.44-7.40 (m, 1H, $H_{\text{arom.}}$), 7.36-7.21 (m, 6H, $H_{\text{arom.}}$), 4.35 (m, 4H, -N⁵-CH₂ und -CH₂), 4.01 und 3.11 (bs, 2H, Azepin-CH₂ (Aufnahme des Spektrums nahe der Koaleszenztemperatur; Übergang zwischen einem s zu zwei d erscheint als zwei bs)); ^{13}C -NMR (100.6 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = 31.2, 42.1, 53.5 (sek. C); 113.6, 120.7, 124.1, 124.9, 125.1, 126.7, 127.0 (2C), 128.2 (2C), 128.6 (tert. C); 109.4, 111.8, 124.0, 127.8, 132.4, 133.0, 136.0, 139.2, 141.0, 168.3, 170.2 (quart. C); CHN: ber. C 59.02, H 3.76, N 8.28, gef.

C 58.86, H 3.74, N 8.75; C₂₅H₁₉BrClN₃O₂ (508.79); MS (EI): m/z (%) = 509 ([M]⁺, 23), 402 ([M-107 (-C₇H₉N)]⁺, 100); HRMS (EI): m/z [M]⁺ ber. 507.03437, gef. 507.03409; HPLC (isokrat.): 96.9% bei 254 nm, 96.2% bei 280 nm, t_N = 3.93 min, t_M (DMSO) = 1.07 min (ACN/H₂O 60:40); λ_{max}: 237 nm, 318 nm, 389 nm.

9-Brom-3-chlor-5-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)-2-oxoethyl]-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino[4,5-b]indol-6(5H)-on (24c)

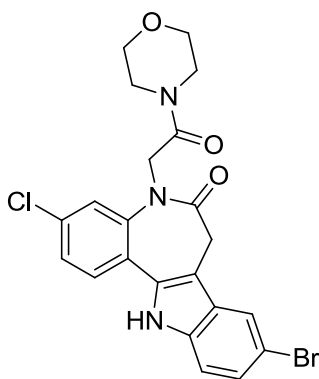


Gearbeitet wurde nach AAV 3 Methode A unter Verwendung von 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-b]indol-5-yl)essigsäure (**39**, 205 mg, 488 μmol), DMF (1 mL), DIPEA (370 μL, 2.12 mmol), PyBOP (285 mg, 548 μmol) und 1-Methylpiperazin (66.6 μL, 600 μmol). Umkristallisiert wurde aus Ethanol. Erhalten wurden 33.6 mg hellgelbes Produkt (14% Ausbeute).

Zers.: ab 211 °C; IR (KBr): 3289 cm⁻¹ (NH), 1643 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (400 MHz, d₆-DMSO): δ (ppm) = 11.99 (s, 1H, Indol-NH), 7.95 (d, 1H, ⁴J_{H,H} = 1.9 Hz, H_{arom.}), 7.72 (d, 1H, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, H_{arom.}), 7.53 (d, 1H, ⁴J_{H,H} = 2.1 Hz, H_{arom.}), 7.47 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, ⁴J_{H,H} = 2.1 Hz, H_{arom.}), 7.42 (d, 1H, ³J_{H,H} = 8.6 Hz, H_{arom.}), 7.30 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 8.6 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.9 Hz, H_{arom.}), 4.32 und 4.71 (bs, 2H, -N⁵-CH₂ (Aufnahme des Spektrums nahe der Koaleszenztemperatur; Übergang zwischen einem s zu zwei d erscheint als zwei bs)), 3.96 und 3.08 (bs, 2H, Azepin-CH₂ (Aufnahme des Spektrums nahe der Koaleszenztemperatur; Übergang zwischen einem s zu zwei d erscheint als zwei bs)), 3.48-3.35 (m, 4H, -CH₂), 2.30-2.19 (m, 4H,

-CH₂), 2.16 (s, 3H, -CH₃); ¹³C-NMR (100.6 MHz, d₆-DMSO): δ (ppm) = 45.6 (-CH₃); 31.1, 41.5, 44.2, 51.7, 54.3, 54.5 (sek. C); 113.6, 120.6, 123.9, 124.8, 125.0, 128.6 (tert. C); 109.3, 111.8, 124.2, 127.7, 132.6, 133.1, 136.0, 140.9, 166.1, 169.8 (quart. C); CHN: ber. C 55.05, H 4.42, N 11.17, gef. C 54.88, H 4.36, N 10.77; C₂₃H₂₂BrClN₄O₂ (501.80); MS (EI): m/z (%) = 502 ([M]⁺, 19), 402 ([M-100 (-C₅H₁₂N₂)]⁺, 38); HRMS (EI): m/z [M]⁺ ber. 500.06092, gef. 500.06046; HPLC (isokrat.): 99.6% bei 254 nm, 99.8% bei 280 nm, t_N = 7.64 min, t_M (DMSO) = 1.07 min (ACN/Puffer 30:70); λ_{max}: 232 nm, 319 nm.

9-Brom-3-chlor-5-(2-morpholino-2-oxoethyl)-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]-indol-6(5*H*)-on (24d)

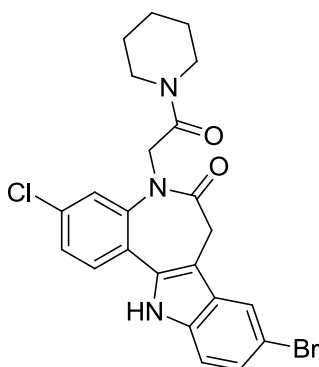


Gearbeitet wurde nach AAV 3 Methode A unter Verwendung von 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**39**, 202 mg, 481 μmol), DMF (1 mL), DIPEA (370 μL, 2.12 mmol), PyBOP (292 mg, 561 μmol) und Morpholin (52.4 μL, 599 μmol). Umkristallisiert wurde aus Diethylether. Erhalten wurden 166 mg farbloses Pulver (70% Ausbeute).

Smp.: 221-223 °C; IR (KBr): 3217 cm⁻¹ (NH), 1652 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (400 MHz, d₆-DMSO): δ (ppm) = 12.00 (s, 1H, Indol-NH), 7.95 (d, 1H, ⁴J_{H,H} = 1.9 Hz, H_{arom.}), 7.72 (d, 1H, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, H_{arom.}), 7.55 (d, 1H, ⁴J_{H,H} = 2.1 Hz, H_{arom.}), 7.48 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, ⁴J_{H,H} = 2.1 Hz, H_{arom.}), 7.42 (d, 1H, ³J_{H,H} = 8.7 Hz, H_{arom.}), 7.30 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 8.6 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.9 Hz, H_{arom.}), 4.41 und 4.77 (bs, 2H, -N⁵-CH₂ (Aufnahme des Spektrums nahe der Koaleszenztemperatur; Übergang zwischen einem s zu zwei d erscheint als zwei bs)), 3.97 und 3.09 (bs, 2H, Azepin-CH₂

(Aufnahme des Spektrums nahe der Koaleszenztemperatur; Übergang zwischen einem *s* zu zwei *d* erscheint als zwei *bs*)), 3.55 (*t*, 4H, $^3J_{H,H} = 4.8$ Hz, $-\text{CH}_2$), 3.42 (*m*, 4H, $-\text{CH}_2$); ^{13}C -NMR (100.6 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = 31.1, 41.9, 44.8, 51.7, 65.9, 66.1 (sek. C); 113.6, 120.7, 124.0, 124.2, 125.1, 128.6 (tert. C); 109.3, 111.8, 124.8, 127.8, 132.4, 133.1, 136.0, 140.9, 166.5, 169.9 (quart. C); $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{BrClN}_3\text{O}_3$ (488.76); MS (EI): m/z (%) = 489 ($[\text{M}]^{+\bullet}$, 16), 402 ($[\text{M}-87$ ($-\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}$)] $^+$, 100); HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^{+\bullet}$ ber. 487.02928, gef. 487.02970; HPLC (isokrat.): 98.0% bei 254 nm, 97.3% bei 280 nm, $t_N = 4.53$ min, t_M (DMSO) = 1.07 min (ACN/ H_2O 50:50); λ_{max} : 232 nm, 319 nm, 391 nm; HPLC (grad.): 95.9% bei 254 nm, $t_N = 11.81$ min, t_M (DMSO) = 1.07 min (Zeit: ACN/ H_2O ; 0 min: 10/90; 10 min: 70/30; 10.5 min: 90/10; 22 min: 90/10).

9-Brom-3-chlor-5-[2-oxo-2-(piperidin-1-yl)ethyl]-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino-[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (24e)

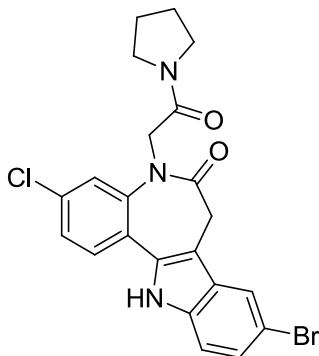


Gearbeitet wurde nach AAV 3 Methode A unter Verwendung von 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**39**, 211 mg, 503 μmol), DMF (1 mL), DIPEA (370 μL , 2.12 mmol), PyBOP (291 mg, 559 μmol) und Piperidin (59.2 μL , 601 μmol). Umkristallisiert wurde aus Ethanol. Erhalten wurden 123 mg farbloses Pulver (50% Ausbeute).

Zers.: ab 180 $^{\circ}\text{C}$; IR (KBr): 3411 cm^{-1} (NH), 1644 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = 11.99 (*s*, 1H, Indol-NH), 7.95 (*d*, 1H, $^4J_{H,H} = 1.9$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.72 (*d*, 1H, $^3J_{H,H} = 8.4$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.52 (*d*, 1H, $^4J_{H,H} = 2.1$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.47 (*dd*, 1H, $^3J_{H,H} = 8.2$ Hz, $^4J_{H,H} = 2.1$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.42 (*d*, 1H, $^3J_{H,H} = 8.6$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.30

(*dd*, 1H, $^3J_{H,H} = 8.6$ Hz, $^4J_{H,H} = 1.9$ Hz, $H_{arom.}$), 4.32 und 4.79 (*bs*, 2H, $-N^5-CH_2$ (Aufnahme des Spektrums nahe der Koaleszenztemperatur; Übergang zwischen einem *s* zu zwei *d* erscheint als zwei *bs*)), 3.97 und 3.08 (*bs*, 2H, Azepin- CH_2 (Aufnahme des Spektrums nahe der Koaleszenztemperatur; Übergang zwischen einem *s* zu zwei *d* erscheint als zwei *bs*)), 3.41 (*m*, 4H, $-CH_2$ (überlagert vom Wassersignal, in einem D_2O -Experiment sichtbar), 1.57 (*m*, 2H, $-CH_2$), 1.44 (*m*, 4H, $-CH_2$); ^{13}C -NMR (100.6 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = 23.9, 25.3, 25.9, 31.2, 42.6, 45.3, 51.8 (sek. C); 113.5, 120.6, 123.7, 124.8, 124.9, 128.5 (tert. C); 109.3, 111.8, 124.1, 127.8, 132.4, 133.1, 136.0, 141.0, 165.8, 169.8 (quart. C); $C_{23}H_{21}BrClN_3O_2$ (486.79); MS (EI): m/z (%) = 487 ($[M]^{+\bullet}$, 11), 402 ($[M-85 (-C_5H_{11}N)]^+$, 100); HRMS (EI): m/z $[M]^{+\bullet}$ ber. 485.05002, gef. 485.05039; HPLC (isokrat.): 99.0% bei 254 nm, 99.1% bei 280 nm, $t_N = 8.58$ min, t_M (DMSO) = 1.07 min (ACN/ H_2O 60:40); λ_{max} : 232 nm, 319 nm; HPLC (grad.): 96.1% bei 254 nm, $t_N = 12.39$ min, t_M (DMSO) = 1.07 min (Zeit: ACN/ H_2O ; 0 min: 10/90; 10 min: 70/30; 10.5 min: 90/10; 22 min: 90/10).

9-Brom-3-chlor-5-[2-oxo-2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl]-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino-[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (24f)

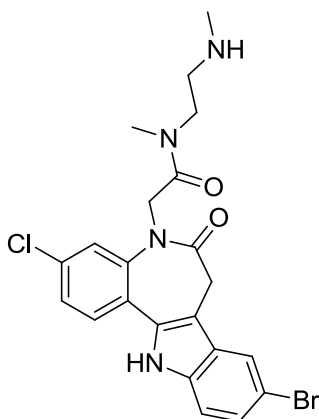


Gearbeitet wurde nach AAV 3 Methode A unter Verwendung von 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**39**, 218 mg, 519 μmol), DMF (1 mL), DIPEA (370 μL , 2.12 mmol), PyBOP (284 mg, 546 μmol) und Pyrrolidin (49.4 μL , 600 μmol). Umkristallisiert wurde aus einem 1:1 Gemisch aus Ethanol und Diethylether. Erhalten wurden 153 mg hellgelbes Pulver (63% Ausbeute).

Zers.: ab 320 °C; IR (KBr): 3385 cm^{-1} (NH), 1625 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = 11.99 (s, 1H, Indol-NH), 7.95 (d, 1H, $^4J_{\text{H,H}} = 2.0$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.72 (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.63 (d, 1H, $^4J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.47 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.42 (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.30 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.9$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 4.29 und 4.68 (bs, 2H, -N⁵-CH₂ (Aufnahme des Spektrums nahe der Koaleszenztemperatur; Übergang zwischen einem s zu zwei d erscheint als zwei bs)), 3.97 und 3.08 (bs, 2H, Azepin-CH₂ (Aufnahme des Spektrums nahe der Koaleszenztemperatur; Übergang zwischen einem s zu zwei d erscheint als zwei bs)), 3.40 (t, 2H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, -CH₂), 3.31 (t, 2H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.7$ Hz, -CH₂), 1.88-1.92 (m, 2H, -CH₂), 1.75-1.78 (m, 2H, -CH₂); ^{13}C -NMR (100.6 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = 23.7, 25.6, 31.1, 45.0, 45.7, 52.9 (sek. C); 113.6, 120.7, 124.1, 124.8, 125.1, 128.5 (tert. C); 109.4, 111.8, 124.1, 127.8, 132.4, 133.1, 136.0, 141.1, 166.0, 169.9 (quart. C); C₂₂H₁₉BrClN₃O₂ (472.76); MS (EI): m/z (%) = 473 ([M]⁺, 11), 402 ([M-71 (-C₄H₉N)]⁺, 100); HRMS (EI): m/z [M]⁺ ber. 471.03437, gef. 471.03434; HPLC (isokrat.): 96.5% bei 254 nm, 95.5% bei 280 nm, $t_{\text{N}} = 6.18$ min, t_{M} (DMSO) = 1.07 min (ACN/Wasser 50:50); λ_{max} : 232 nm, 319 nm;

HPLC (grad.): 97.0% bei 254 nm, $t_N = 11.17$ min, t_M (DMSO) = 1.07 min
(Zeit: ACN/H₂O; 0 min: 10/90; 10 min: 70/30; 10.5 min: 90/10; 22 min: 90/10).

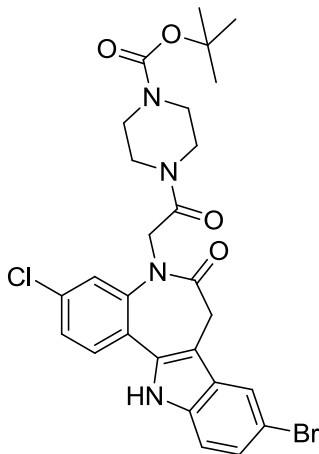
Versuche zur Darstellung von 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo-[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-*N*-methyl-*N*-[2-(methylamino)ethyl]acetamid (**24g**)



Gearbeitet wurde nach AAV 3 Methode A unter Verwendung von 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**39**, 206 mg, 491 μ mol), DMF (1 mL), DIPEA (370 μ L, 2.12 mmol), PyBOP (284 mg, 546 μ mol) und *N,N'*-Dimethylethylendiamin (1.30, 6.00 oder 20.0 Äquivalente). Das erhaltene Produktgemisch wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Laufmittel 4:1 Toluol/Ethanol bis 1:1 Toluol/Ethanol). Umkristallisiert wurde zunächst aus Diethylether und anschließend aus Ethanol. Das Produkt konnte massenspektrometrisch nachgewiesen, aber nicht als sauberes Produkt isoliert werden.

C₂₂H₂₂BrClN₄O₂ (489.79); MS (EI): m/z (%) = 488 ([M]⁺•, 2), 402 ([M-86 (-C₄H₁₁N₂)]⁺, 46); HRMS (EI): m/z [M]⁺• ber. 488.06092, gef. 488.05877.

tert-Butyl-4-[2-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]-indol-5-yl)acetyl]piperazin-1-carboxylat (**24h**)

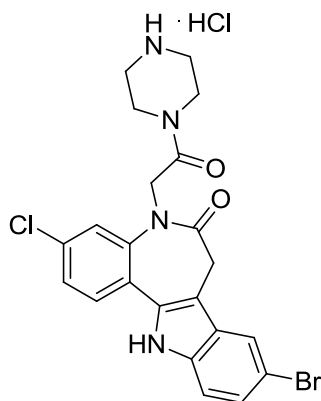


Gearbeitet wurde nach AAV 3 Methode A unter Verwendung von 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**39**, 410 mg, 977 μ mol), DMF (2 mL), DIPEA (740 μ L, 4.25 mmol), PyBOP (576 mg, 1.11 mmol) und Boc-Piperazin (223 mg, 1.20 mmol). Umkristallisiert wurde aus Ethanol. Erhalten wurden 154 mg farbloses Pulver (27% Ausbeute).

Smp.: 281-282 °C; IR (KBr): 3255 cm^{-1} (NH), 1640 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = 11.99 (s, 1H, Indol-NH), 7.95 (d, 1H, $^4J_{\text{H,H}} = 1.9$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.72 (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.56 (d, 1H, $^4J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.47 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.42 (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.7$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.30 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.9$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 4.50 und 4.72 (bs, 2H, -N⁵-CH₂ (Aufnahme des Spektrums nahe der Koaleszenztemperatur; Übergang zwischen einem s zu zwei d erscheint als zwei bs)), 3.96 und 3.08 (bs, 2H, Azepin-CH₂ (Aufnahme des Spektrums nahe der Koaleszenztemperatur; Übergang zwischen einem s zu zwei d erscheint als zwei bs)), 3.41 (d, 4H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$ Hz, -CH₂), 3.33-3.20 (m, 4H, -CH₂), 1.40 (s, 9H, *tert*-Butyl-CH₃); ^{13}C -NMR (100.6 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = 30.0 (3C, *tert*-Butyl-CH₃); 31.1, 41.3 (2C), 44.0 (2C), 51.7 (sek. C); 113.5, 120.6, 123.9, 124.8, 125.0, 128.6 (tert. C); 79.1, 109.3, 111.8, 124.2, 127.7, 132.4, 133.1, 136.0, 140.8, 153.7, 166.5, 169.9 (quart. C); CHN: ber. C 55.16, H 4.80, N 9.53, gef. C 55.24, H 4.78, N 9.43; C₂₇H₂₈BrClN₄O₄ (587.89); MS (EI):

m/z (%) = 588 ($[M]^{+\bullet}$, 65), 402 ($[M-186 (-C_9H_{18}N_2O_2)]^+$, 100); HRMS (EI): m/z $[M]^{+\bullet}$ ber. 586.09770, gef. 586.09783; HPLC (isokrat.): 99.0% bei 254 nm, 99.2% bei 280 nm, t_N = 4.78 min, t_M (DMSO) = 1.07 min (ACN/H₂O 60:40); λ_{max} : 234 nm, 228 nm, 319 nm; HPLC (grad.): 98.6% bei 254 nm, t_N = 12.03 min, t_M (DMSO) = 1.07 min (Zeit: ACN/H₂O; 0 min: 10/90; 10 min: 70/30; 10.5 min: 90/10; 22 min: 90/10).

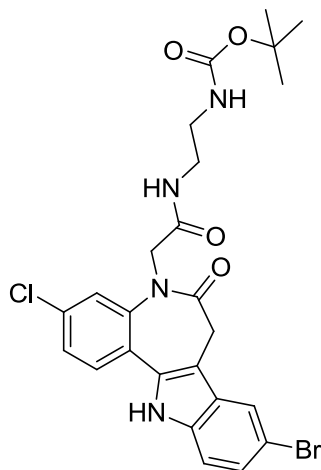
9-Brom-3-chlor-5-[2-oxo-2-(piperazin-1-yl)ethyl]-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino-[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on-Hydrochlorid (**24k**)



tert-Butyl-4-[2-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino-[4,5-*b*]indol-5-yl)acetyl]piperazin-1-carboxylat (**24h**, 110 mg, 187 μ mol) wurde unter Stickstoffatmosphäre in getrocknetem Dichlormethan (13.4 mL) suspendiert und Trifluoressigsäure (2.7 mL) hinzugegeben. Die Mischung wurde 23 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer vom Reaktionsansatz abdestilliert. Der ölige Rückstand wurde in Isopronanol (3 mL) aufgenommen und mit 3 Tropfen einer 5 molaren Salzsäurelösung in Propan-2-ol versetzt. Bei der Zugabe von Diethylether (20 mL) fiel farbloser Niederschlag aus. Das Gemisch wurde 1 h zum Rückfluss erhitzt und anschließend über Nacht bei 8 °C gelagert. Der ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt und mit Diethylether gewaschen. Nach dem Trocknen konnten 82 mg farbloses Pulver gewonnen werden (90% Ausbeute).

Zers.: ab 240 °C; IR (KBr): 3410 cm⁻¹ (NH), 1655 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (400 MHz, d₆-DMSO): δ (ppm) = 12.09 (s, 1H, Indol-NH), 9.26 (bs, 2H, -NH⁺HCl), 7.95 (d, 1H, ⁴J_{H,H} = 1.9 Hz, H_{arom.}), 7.74 (d, 1H, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, H_{arom.}), 7.56 (d, 1H, ⁴J_{H,H} = 2.1 Hz, H_{arom.}), 7.48 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, ⁴J_{H,H} = 2.1 Hz, H_{arom.}), 7.43 (d, 1H, ³J_{H,H} = 8.6 Hz, H_{arom.}), 7.30 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 8.6 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.9 Hz, H_{arom.}), 4.48 und 4.78 (bs, 2H, -N⁵-CH₂ (Aufnahme des Spektrums nahe der Koaleszenztemperatur; Übergang zwischen einem s zu zwei d erscheint als zwei bs)), 3.96 und 3.08 (bs, 2H, Azepin-CH₂ (Aufnahme des Spektrums nahe der Koaleszenztemperatur; Übergang zwischen einem s zu zwei d erscheint als zwei bs)), 3.68 (bs, 4H, -CH₂), 3.08-3.10 (m, 4H, -CH₂); ¹³C-NMR (100.6 MHz, d₆-DMSO): δ (ppm) = 31.1, 38.3, 41.3, 42.6 (2C), 51.7 (sek. C); 113.7, 120.6, 124.0, 124.2, 125.2, 128.7 (tert. C); 109.3, 111.8, 124.8, 127.7, 132.4, 133.1, 136.0, 140.8, 166.7, 170.0 (quart. C); C₂₂H₂₁BrCl₂N₄O₂ (524.24); MS (EI): m/z (%) = 488 ([M]⁺, 19), 402 ([M-86 (-C₄H₁₀N₂)]⁺, 100); HRMS (EI): m/z [M]⁺ ber. 486.04527, gef. 486.04545; HPLC (isokrat.): 98.4% bei 254 nm, 97.8% bei 280 nm, t_N = 7.13 min, t_M (DMSO) = 1.07 min (ACN/Puffer 30:70); λ_{max}: 232 nm, 319 nm, 395 nm.

tert-Butyl-{2-[2-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]-indol-5-yl)acetamido]ethyl}carbammat (**24I**)

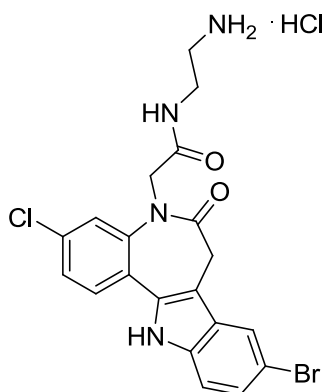


Gearbeitet wurde nach AAV 3 Methode B unter Verwendung von 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**39**, 402 mg, 957 μ mol), DMF (2 mL), DIPEA (740 μ L, 4.25 mmol), PyBOP (587 mg, 1.13 mmol) und Boc-Ethylendiamin (190 μ L, 1.20 mmol). Umkristallisiert wurde aus Ethanol. Erhalten wurden 403 mg hellgelbes Pulver (75% Ausbeute).

Zers.: ab 265 °C; IR (KBr): 3336 cm^{-1} (NH), 1679 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = 11.98 (s, 1H, Indol-NH), 9.26 (t, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$ Hz, -NH), 7.99-7.92 (m, 1H, $H_{\text{arom.}}$), 7.72 (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.67 (d, 1H, $^4J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.48 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.42 (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.30 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.9$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 6.82 (t, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$ Hz, -NH), 4.51-3.76 (m, 3H, -N⁵-CH₂ und Azepin-CH), 3.22-2.92 (m, 5H, -CH₂ und Azepin-CH), 1.38 (s, 9H, *tert*-Butyl-CH₃); ^{13}C -NMR (100.6 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = 28.8 (3C, *tert*-Butyl-CH₃); 31.7, 39.5, 40.0, 54.1 (sek. C); 114.2, 121.3, 124.7, 125.5, 125.7, 129.2 (tert. C); 77.7, 109.3, 111.8, 124.1, 127.7, 132.4, 133.0, 136.0, 140.1, 168.3 (2C), 170.1 (quart. C); CHN: ber. C 53.44, H 4.66, N 9.97, gef. C 53.42, H 4.62, N 9.87; C₂₅H₂₆BrClN₄O₄ (561.86); MS (EI): m/z (%) = 562 ([M]⁺, 4), 402 ([M-160 (-C₇H₁₆N₂O₂)]⁺, 100); HRMS (EI): m/z [M]⁺ ber. 560.08205, gef. 560.08265; HPLC (isokrat.): 97.3% bei 254 nm, 98.1% bei 280 nm, $t_{\text{N}} = 3.42$ min, t_{M} (DMSO) = 1.07 min (ACN/H₂O 60:40); λ_{max} : 240 nm, 317 nm; HPLC

(grad.): 97.7% bei 254 nm, $t_N = 12.37$ min, t_M (DMSO) = 1.07 min (Zeit: ACN/H₂O; 0 min: 10/90; 10 min: 70/30; 10.5 min: 90/10; 22 min: 90/10).

N-(2-Aminoethyl)-2-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino-[4,5-*b*]indol-5-yl)acetamid-Hydrochlorid (**24m**)

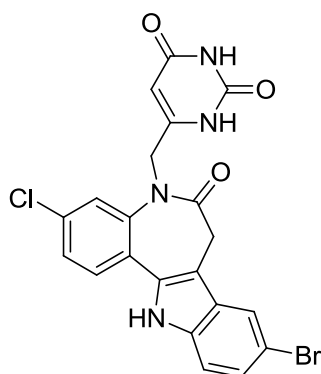


tert-Butyl-{2-[2-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino-[4,5-*b*]indol-5-yl)acetamido]ethyl}carbamat (**24i**, 350 mg, 623 μ mol) wurde unter Stickstoffatmosphäre in getrocknetem Dichlormethan (44.5 mL) suspendiert und Trifluoressigsäure (9 mL) hinzugegeben. Die Mischung wurde 23 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer vom Reaktionsansatz abdestilliert. Der ölige Rückstand wurde in Isopronanol (9 mL) aufgenommen und mit 9 Tropfen einer 5 molaren Salzsäurelösung in Propan-2-ol versetzt. Bei der Zugabe von Diethylether (40 mL) fiel farbloser Niederschlag aus. Das Gemisch wurde 1 h zum Rückfluss erhitzt und anschließend über Nacht bei 8 °C gelagert. Der ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt und mit Diethylether gewaschen. Nach dem Trocknen konnten 285 mg farblores Pulver gewonnen werden (99% Ausbeute).

Zers.: ab 210 °C; IR (KBr): 3307 cm^{-1} (NH), 1655 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = 12.13 (s, 1H, Indol-NH), 9.26 (t, 1H, $^3J_{H,H} = 5.6$ Hz, -NH), 8.03 (m, 3H, -NH₂ \cdot HCl), 7.95 (d, 1H, $^4J_{H,H} = 2.1$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.75 (d, 1H, $^3J_{H,H} = 8.5$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.70 (d, 1H, $^4J_{H,H} = 2.1$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.48 (dd, 1H,

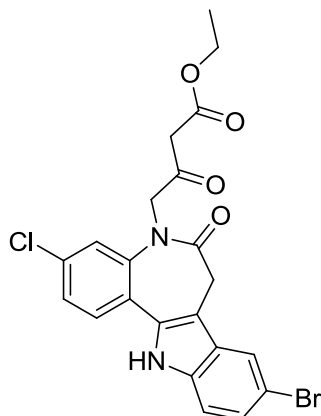
$^3J_{H,H} = 8.4$ Hz, $^4J_{H,H} = 2.1$ Hz, $H_{arom.}$), 7.44 (*d*, 1H, $^3J_{H,H} = 8.6$ Hz, $H_{arom.}$), 7.30 (*dd*, 1H, $^3J_{H,H} = 8.6$ Hz, $^4J_{H,H} = 1.9$ Hz, $H_{arom.}$), 4.61 (*b*, 2H, $-N^5-CH_2$ (Aufnahme des Spektrums nahe der Koaleszenztemperatur; Übergang zwischen einem *s* zu zwei *d* erscheint als *b*)), 3.96 und 3.12 (*bs*, 2H, Azepin- CH_2 (Aufnahme des Spektrums nahe der Koaleszenztemperatur; Übergang zwischen einem *s* zu zwei *d* erscheint als zwei *bs*)), 3.40 (*bs*, 2H, $-CH_2$ (überlagert vom Wassersignal)), 2.88 (*t*, 2H, $^3J_{H,H} = 6.2$ Hz, CH_2); ^{13}C -NMR (100.6 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = 31.2, 36.4, 38.5, 53.7 (sek. C); 113.7, 120.6, 124.0, 124.2, 125.2, 128.7 (tert. C); 109.2, 111.8, 124.9, 127.7, 132.4, 133.0, 136.0, 140.1, 168.0, 170.2 (quart. C); $C_{20}H_{19}BrCl_2N_4O_2$ (498.20); MS (EI): m/z (%) = 462 ($[M]^{+\bullet}$, 8), 444 ($[M-18 (-H_2O)]^+$, 47), 402 ($[M-60 (-C_2H_8N_2)]^+$, 32); HRMS (EI): m/z $[M]^{+\bullet}$ ber. 460.02862, gef. 460.02980; HPLC (isokrat.): 95.2% bei 254 nm, 98.4% bei 280 nm, $t_N = 5.44$ min, t_M (DMSO) = 1.07 min (ACN/Puffer 30:70); λ_{max} : 236 nm, 228 nm, 318 nm.

Versuch zur Synthese von 6-[(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]-azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)methyl]pyrimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**25**)

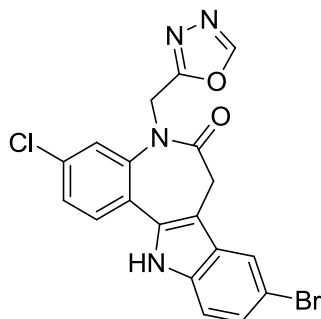


Gearbeitet wurde nach AAV 2 unter Einsatz von 9-Brom-3-chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]-benzazepin-6(5*H*)-on (**20a**, 152 mg, 420 μ mol), Kalium-*tert*-butylat (59.2 mg, 527 μ mol) und 6-Chlormethyluracil (**48**, 141 mg, 879 μ mol) in getrocknetem Tetrahydrofuran (12.5 mL). Es wurde aus Ethanol umkristallisiert. Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden.

Versuch zur Synthese von Ethyl-4-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo-[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)-3-oxobutanoat (**26**)



Unter Stickstoffatmosphäre wurden zu einer Suspension aus 9-Brom-3-chlor-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**20a**, 1.07 g, 2.97 mmol) in Toluol (10 mL) Kaliumhydroxid (278 mg, 4.95 mmol) hinzugegeben. Anschließend wurden Tetrabutylammoniumbromid (316 g, 980 μ mol) und γ -Bromacetessigsäureethylester (**47**, 1.24 g, 5.94 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung 5 h bei 70 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der entstandene Niederschlag abgesaugt und mit Aceton nachgewaschen. Vom Filtrat wurde unter vermindertem Druck das Lösungsmittel abdestilliert und der verbliebene Rückstand aus Ethanol umkristallisiert. Durch diese Methode der Aufarbeitung konnte lediglich Edukt isoliert werden (226 mg, 21%).

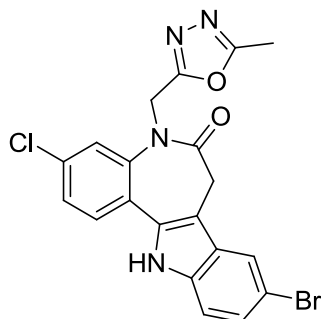
Versuche zur Synthese von 5-[(1,3,4-Oxadiazol-2-yl)methyl]-9-brom-3-chlor-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**27a**)

Zu einer Suspension aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)acetohydrazid (**28**, 203 mg, 468 μmol) in Eisessig (1.5 mL) wurde unter Stickstoffatmosphäre Triethylorthoformiat (500 μL , 3.00 mmol) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde so lange zum Rückfluss erhitzt, bis dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr detektiert werden konnte (8 h). Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur abgekühlt, der entstandene Niederschlag abgesaugt und je einmal mit kaltem Ethanol und Petrolether gewaschen. Zuletzt wurde der Filterkuchen aus Ethanol umkristallisiert. Es wurde ein Produktgemisch erhalten. Die Isolierung des sauberen Produktes gelang nicht.

$\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{BrClN}_4\text{O}_2$ (443.68); MS (EI): m/z (%) = 443 ($[\text{M}]^{+\bullet}$, 11), 361 ($[\text{M}-82$ ($-\text{C}_3\text{H}_3\text{N}_2\text{O})$] $^{+}$, 100).

Eine Mischung aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)acetohydrazid (**28**, 214 mg, 493 μmol) und Triethylorthoformiat (2.80 mL, 17.0 mmol) wurde 8 h zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde überschüssiges Triethylorthoformiat am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wurde aus Ethanol umkristallisiert. Es konnten weder Edukt wiedergewonnen noch Produkt isoliert werden.

Versuche zur Synthese von 9-Brom-3-chlor-5-[(5-methyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)methyl]-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-6(5*H*)-on (**27b**)

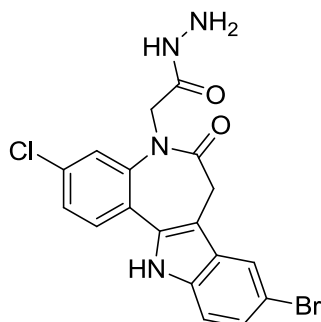


Zu einer Suspension aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)acetohydrazid (**28**, 200 mg, 461 μmol) in Eisessig (1.5 mL) wurde unter Stickstoffatmosphäre Triethylorthoacetat (500 μL , 2.74 mmol) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde so lange zum Rückfluss erhitzt, bis dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr detektiert werden konnte (17 h). Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur abgekühlt, der entstandene Niederschlag abgesaugt und je einmal mit kaltem Ethanol und Petrolether gewaschen. Zuletzt wurde der Filterkuchen aus Ethanol umkristallisiert. Es wurde ein Produktgemisch erhalten. Die Isolierung des sauberen Produktes gelang nicht.

$\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{BrClN}_4\text{O}_2$ (457.71); MS (EI): m/z (%) = 457 ($[\text{M}]^{+\bullet}$, 13), 361 ($[\text{M}-96$ ($-\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{O})$] $^{+}$, 73).

Eine Mischung aus 2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)acetohydrazid (**28**, 196 mg, 452 μmol) und Triethylorthoacetat (3.00 mL, 16.4 mmol) wurde 8 h zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde überschüssiges Triethylorthoacetat am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wurde aus Ethanol umkristallisiert. Es konnten weder Edukt wiedergewonnen noch Produkt isoliert werden.

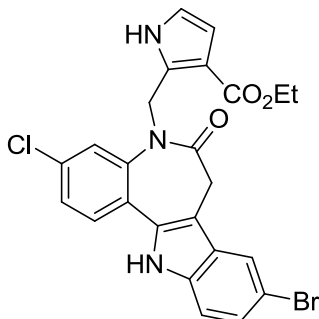
2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)aceto-
hydrazid (**28**)



Ethyl-2-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]-indol-5-yl)acetat (**23b**, 277 mg, 618 μmol) und Hydrazinhydrat (600 μL , 12.4 mmol) wurden in absolutem Ethanol (6 mL) suspendiert und unter Rühren 8 h refluxiert. Nach weiteren 12 h, in denen bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde die Reaktionslösung auf Eiswasser gegeben, der entstandene Niederschlag abgesaugt und aus Ethanol umkristallisiert. So konnten 200 mg farblores Pulver erhalten werden (75% Ausbeute).

Zers.: ab 317 $^{\circ}\text{C}$; IR (KBr): 3315 cm^{-1} (NH), 1664 cm^{-1} (C=O), 1642 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = 11.97 (s, 1H, Indol-NH), 9.27 (s, 1H, Hydrazid-NH), 7.96 (d, 1H, $^4J_{\text{H,H}} = 1.9$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.70-7.72 (m, 2H, $H_{\text{arom.}}$), 7.48 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.0$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.42 (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.30 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.9$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 4.29 (b, 5H, Azepin-CH, -NH₂ und -N⁵-CH₂ überlagert), 3.11 (bs, 1H, Azepin-CH); ^{13}C -NMR (100.6 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = 31.2 (Azepin-CH₂); 52.3 (-N⁵-CH₂); 113.6, 120.7, 124.0, 124.9, 125.1, 128.5 (tert. C); 109.3, 111.8, 124.2, 127.7, 132.4, 133.0, 136.0, 141.1, 167.8, 170.0 (quart. C); CHN: ber. C 49.85, H 3.25, N 12.92, gef. C 49.61, H 3.08, N 12.49; C₁₈H₁₄BrClN₄O₂ (433.69); MS (EI): m/z (%) = 434 ([M]⁺, 20), 403 ([M-31 (-N₂H₃)]⁺, 83), 361 ([M-73 (-C₂H₅N₂O)]⁺, 43), 347 ([M-87]⁺, 100); HRMS (EI): m/z [M]⁺ ber. 431.99832, gef. 431.99759; HPLC (isokrat.): 99.4% bei 254 nm, 99.9% bei 280 nm, $t_{\text{N}} = 5.42$ min, t_{M} (DMSO) = 1.07 min (ACN/H₂O 40:60); λ_{max} : 231 nm, 319 nm, 394 nm.

Ethyl-2-[(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)methyl]-1*H*-pyrrol-3-carboxylat (**30**)

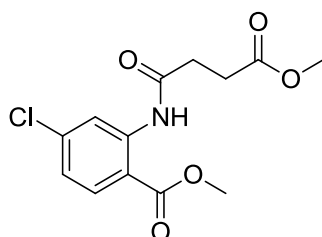


Ethyl-2-[(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)methyl]-1-(phenylsulfonyl)-1*H*-pyrrol-3-carboxylat (**56**, 152 mg, 233 μmol) und Kaliumhydroxid (29.4 mg, 520 μmol) wurden in Ethanol (3 mL) suspendiert und 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Der farblose Rückstand wurde in entionisiertem Wasser (25 mL) aufgenommen und viermal mit Diethylether (insgesamt 200 mL) extrahiert. Nach Entfernung des Ethers unter vermindertem Druck wurde das gewonnene Pulver aus Ethanol umkristallisiert. Erhalten wurden 63 mg farbloser Feststoff (53% Ausbeute).

Zers.: ab 240 °C; IR (KBr): 3319 cm^{-1} (NH), 1668 cm^{-1} (C=O), 1652 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (600 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = 11.97 (s, 1H, Indol-NH), 11.22 (s, 1H, Pyrrol-NH), 7.99 (d, 1H, $^4J_{\text{H,H}} = 1.9 \text{ Hz}$, $H_{\text{arom.}}$), 7.65 (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.7 \text{ Hz}$, $H_{\text{arom.}}$), 7.44-7.37 (m, 3H, $H_{\text{arom.}}$), 7.30 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{H,H}} = 1.9 \text{ Hz}$, $H_{\text{arom.}}$), 6.64-6.66 (m, 1H, Pyrrol-CH), 6.29-6.31 (m, 1H, Pyrrol-CH), 5.19 (bs, 2H, -N⁵-CH₂), 3.95 (b, 2H, -CH₂), 1.13 (t, 3H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.7 \text{ Hz}$, -CH₃), Azepin-CH₂ sehr breit von 3.00 bis 4.50 ppm und von anderen Peaks überlagert; ^{13}C -NMR (150.9 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = 14.2 (-CH₃); 31.6, 45.5, 58.8 (sek. C); 109.6, 113.5, 118.1, 120.8, 124.0, 124.8, 125.1, 128.6 (tert. C); 109.4, 111.6, 111.7, 124.4, 127.9, 132.0, 132.8, 133.1, 136.0, 139.8, 164.1, 170.7 (quart. C); CHN: ber. C 56.21, H 3.73, N 8.19, gef. C 55.91, H 3.65, N 8.15; C₂₄H₁₉BrClN₃O₃ (512.78); MS (EI): m/z (%) = 513 ([M]⁺, 22), 362 ([M-151 (-C₈H₉NO₂)⁺, 100); HPLC (isokrat.): 98.5% bei 254 nm, 98.6% bei

280 nm, $t_N = 6.47$ min, t_M (DMSO) = 1.07 min (ACN/H₂O 60:40); λ_{\max} : 232 nm, 320 nm, 382 nm; HPLC (grad.): 93.2% bei 254 nm, $t_N = 13.19$ min, t_M (DMSO) = 1.07 min (Zeit: ACN/H₂O; 0 min: 10/90; 10 min: 70/30; 10.5 min: 90/10; 22 min: 90/10).

2-[(4-Methoxy-4-oxobutanoyl)amino]-4-chlorbenzoesäuremethylester (31)

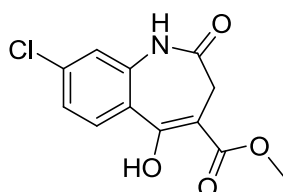


2-Amino-4-chlorbenzoesäuremethylester (512 mg, 2.75 mmol) wurde in getrocknetem Toluol (4.7 mL) gelöst und mit Pyridin (0.3 mL) versetzt. Zu der entstandenen Lösung wurde unter Rühren und Kühlen im Eisbad eine Lösung aus Bernsteinsäuremethylesterchlorid (400 μ L, 3.38 mmol) und getrocknetem Toluol (1.4 mL) langsam hinzuge tropft. Nach vollständiger Zugabe wurde die Suspension auf 80 °C erhitzt. Nach 2 h Rühren bei 80 °C wurde die Reaktion auf Raumtemperatur abgekühlt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und noch zweimal mit Toluol gewaschen. Das Filtrat wurde nacheinander mit je 20 mL 10%iger wässriger Salzsäure, 10%iger wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung und entionisiertem Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Die resultierenden hellbraunen Kristalle wurden aus Methanol umkristallisiert. Erhalten wurden 667 mg farblose, nadelförmige Kristalle (81% Ausbeute).

Smp.: 94-95 °C (Lit.⁸³: 95-96 °C); IR (KBr): 3254 cm⁻¹ (NH), 1741 cm⁻¹ (C=O) 1702 cm⁻¹ (C=O), 1685 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (600 MHz, d₆-DMSO): δ (ppm) = 10.74 (s, 1H, -NH), 8.39 (d, 1H, ⁴J_{H,H} = 2.2 Hz, *H*_{arom}), 7.93 (d, 1H, ³J_{H,H} = 8.6 Hz, *H*_{arom}), 7.27 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 8.6 Hz, ⁴J_{H,H} = 2.2 Hz, *H*_{arom}), 3.87 (s, 3H, -OCH₃), 3.61 (s,

3H, -OCH₃), 2.74-2.68 (m, 2H, -CH₂), 2.60-2.64 (m, 2H, -CH₂); ¹³C-NMR (150.9 MHz, d₆-DMSO): δ (ppm) = 51.3, 52.6 (-OCH₃); 28.1, 31.5 (sek. C); 120.0, 122.9, 132.2 (tert. C); 115.8, 138.3, 140.6, 166.8, 170.4, 172.5 (quart. C); CHN: ber. C 52.10, H 4.71, N 4.67, gef. C 52.32, H 4.80, N 4.56; C₁₃H₁₄NO₅Cl (299.71).

8-Chlor-5-hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1H-1-benzazepin-4-carbonsäuremethylester
(32)

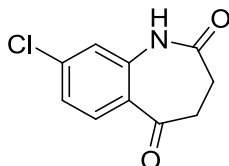


Gearbeitet wurde unter Stickstoffatmosphäre. Zu einer im Eisbad rührenden Suspension aus Kalium-*tert*-butylat (1.53 g, 13.6 mmol) in getrocknetem Toluol (4 mL) wurde eine Lösung aus 2-[(4-Methoxy-4-oxobutanoyl)amino]-4-chlorbenzoesäuremethylester (**31**, 1.06 g, 3.60 mmol) in getrocknetem Toluol (8 mL) und Dimethylformamid (1.2 mL) langsam hinzugeotropft. Nach vollständiger Zugabe der Lösung wurde die Suspension bei 80 °C für 3.5 h gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden Eisessig (0.8 mL) und entionisiertes Wasser (8 mL) zum Reaktionsansatz hinzugegeben. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt und mit viel entionisiertem Wasser und zuletzt einmal mit Petrolether gewaschen. Der abgesaugte Feststoff wurde aus Ethanol umkristallisiert. Erhalten wurden 825 mg farbloses Pulver (86% Ausbeute).

Zers.: 266-267 °C (kein Smp./Zers. in der Literatur⁸³ angegeben); IR (KBr): 2881-3417 cm⁻¹ (OH), 3198 cm⁻¹ (NH), 1727 cm⁻¹ (C=O), 1657 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (600 MHz, d₆-DMSO): δ (ppm) = 12.41 (s, 1H, -OH), 10.47 (s, 1H, -NH), 7.81 (d, 1H, ³J_{H,H} = 8.6 Hz, H_{arom}), 7.33 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 8.6 Hz, ⁴J_{H,H} = 2.2 Hz, H_{arom}), 7.24 (d, 1H, ⁴J_{H,H} = 2.2 Hz, H_{arom}), 3.84 (s, 3H, -OCH₃), 2.97 (s, 2H, Azepin-CH₂); ¹³C-NMR (150.9 MHz, d₆-DMSO): δ (ppm) = 30.7 (-OCH₃); 52.6 (Azepin-CH₂); 120.8, 123.5,

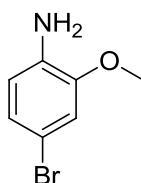
130.0 (tert. C); 96.0, 123.6, 136.0, 139.0, 165.0, 170.6, 171.8 (quart. C); CHN: ber. C 53.85, H 3.77, N 5.23, gef. C 54.04, H 3.60, N 4.90; C₁₂H₁₀NO₄Cl (267.67).

8-Chlor-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (33)



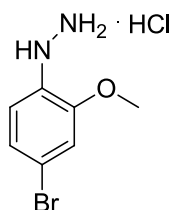
Zu einer Lösung aus 8-Chlor-5-hydroxy-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-1-benzazepin-4-carbonsäuremethylester (**32**, 402 mg, 1.50 mmol) in Dimethylsulfoxid (27 mL) wurde unter Stickstoffatmosphäre entionisiertes Wasser (3 mL) hinzugegeben und die Suspension auf 150 °C erhitzt. Bei dieser Temperatur wurde 6 h gerührt. Anschließend wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und die Reaktionsmischung auf entionisiertes Wasser (30 mL) geschüttet. Bei der Lagerung über Nacht im Kühlschrank bildeten sich Kristalle aus. Diese wurden abgesaugt und aus Ethanol umkristallisiert. Erhalten wurden 254 mg hellgrüne Kristalle (81% Ausbeute).

Zers.: 209-212 °C (kein Smp./Zers. in der Literatur⁸³ angegeben); IR (KBr): 3211 cm⁻¹ (NH), 1664 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (600 MHz, d₆-DMSO): δ (ppm) = 10.22 (s, 1H, -NH), 7.85 (d, 1H, ³J_{H,H} = 8.2 Hz, H_{arom}), 7.25-7.24 (m, 1H, H_{arom}), 7.23 (d, 1H, ⁴J_{H,H} = 2.1 Hz, H_{arom}), 2.95-2.87 (m, 2H, -CH₂), 2.74-2.64 (m, 2H, -CH₂); ¹³C-NMR (150.9 MHz, d₆-DMSO): δ (ppm) = 29.0, 37.7 (-CH₂); 120.7, 123.1, 132.3 (tert. C); 125.1, 138.3, 140.5, 173.4, 197.3 (quart. C); CHN: ber. C 57.30, H 3.85, N 6.68, gef. C 57.33, H 3.86, N 6.70; C₁₀H₈NO₂Cl (209.63).

4-Brom-2-methoxyanilin⁸⁵ (35)

o-Anisidin (4.60 mL, 40.6 mmol) wurde in Eisessig (50 mL) vorgelegt und auf 12-14 °C gekühlt. Unter Einhaltung der Temperatur von 12-14 °C wurde eine Lösung aus Brom (1.90 mL, 38.0 mmol) in Eisessig (25 mL) langsam zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde der entstandene Niederschlag abgesaugt und solange mit Eisessig gewaschen, bis das Filtrat farblos war. Der zurückbleibende Niederschlag wurde in wenig entionisiertem Wasser aufgenommen. Durch Zugabe von 10%iger wässriger Kaliumhydroxidlösung bildeten sich zwei Phasen aus. Es wurde solange 10%ige Kaliumhydroxidlösung hinzugegeben, bis sich die überstehende Lösung bei einer weiteren Zugabe von Kaliumhydroxidlösung nicht weiter trübte. Bei der Lagerung über Nacht im Kühlschrank verfestigte sich die violette Phase am Boden des Gefäßes, und aus der überstehenden Lösung fielen nadelförmige, farblose Kristalle aus. Die zwei Feststoffe wurden voneinander getrennt, und der entstandene violette Feststoff wurde so oft mit je 4 ml Petrolether ausgekocht, bis sich nach Lagerung über Nacht im Kühlschrank keine farblosen Kristalle mehr ausbildeten. Die so erhaltenen Kristalle wurden aus Petrolether umkristallisiert. Erhalten wurden 1.15 g graue Nadeln (14% Ausbeute).

Smp.: 56-59 °C (Lit.⁸⁵: 61-62 °C); ¹H-NMR (600 MHz, *d*₆-DMSO): δ (ppm) = 6.90 (*d*, 1H, ⁴*J*_{H,H} = 2.2 Hz, *H*_{arom}), 6.82 (*dd*, 1H, ³*J*_{H,H} = 8.3 Hz, ⁴*J*_{H,H} = 2.2 Hz, *H*_{arom}), 6.56 (*d*, 1H, ³*J*_{H,H} = 8.3 Hz, *H*_{arom}), 4.88 (*s*, 2H, -NH₂), 3.76 (*s*, 3H, -OCH₃); ¹³C-NMR (150.9 MHz, *d*₆-DMSO): δ (ppm) = 55.5 (-OCH₃); 113.2, 114.6, 123.2 (*tert.* C); 106.0, 137.1, 147.0 (*quart.* C); CHN: ber. C 41.61, H 3.99, N 6.93, gef. C 41.70, H 4.05, N 7.00; C₇H₈BrNO (202.05).

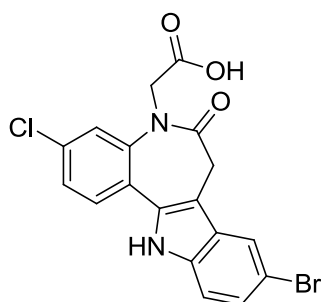
(4-Brom-2-methoxyphenyl)hydrazin-Hydrochlorid⁸⁵ (37)

Zu einer im Eis-Salzbad gekühlten Suspension aus 4-Brom-2-methoxyanilin (**35**, 823 mg, 4.07 mmol) in Salzsäure (3.2 mL) wurde eine Lösung aus Natriumnitrit (283 mg, 4.10 mmol) in entionisiertem Wasser (2.8 mL) so langsam zugetropft, dass die Temperatur nicht über 0 °C anstieg. Dabei bildete sich eine rot-braune Lösung, welche nach vollständiger Zugabe noch eine halbe Stunde im Eis-Salzbad gerührt wurde. Zu dieser Lösung wurde eine vorgekühlte Suspension aus Zinn(II)chlorid-Dihydrat (2.74 g, 12.1 mmol) in entionisiertem Wasser (5.6 mL) zugegeben. Nach vollständiger Zugabe wurde der entstandene Niederschlag abgesaugt und mit gesättigter wässriger Natriumchloridlösung und einer gekühlten 2:1-Mischung Petrolether/*tert*-Butylmethylether gewaschen. Der gewaschene Rückstand wurde unter Eiskühlung in konzentrierter wässriger Natriumhydroxidlösung (250 mL) aufgenommen und durch Zugabe von *tert*-Butylmethylether (100 mL) in Lösung gebracht. Die organische Phase wurde von der wässrigen getrennt, welche noch viermal mit gekühltem *tert*-Butylmethylether (je 70 mL) extrahiert wurde. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit entionisiertem Wasser gewaschen (je 50 mL). In die entstandene hellgelbe Lösung wurde unverzüglich unter Kühlung im Eis-Salzbad Chlorwasserstoffgas eingeleitet, wobei voluminöser, farbloser Niederschlag ausfiel. Dieser wurde abfiltriert, mit Essigsäureethylester gewaschen und aus einem 2:1-Gemisch Essigsäureethylester/Ethanol umkristallisiert. Erhalten wurden ein farbloses Pulver (29% Ausbeute).

Smp.: 168-170 °C (Lit.⁸⁵: 179-180 °C); ¹H-NMR (400 MHz, d₆-DMSO): δ (ppm) = 10.00 (bs, 3H, -NH₂⁺HCl), 7.70 (s, 1H, -NH), 7.16 (d, 1H, ⁴J_{H,H} = 2.1 Hz, H_{arom}), 7.11 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, ⁴J_{H,H} = 2.1 Hz, H_{arom}), 6.97 (d, 1H, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, H_{arom}), 3.85 (s, 3H, -OCH₃); ¹³C-NMR (100.6 MHz, d₆-DMSO):

δ (ppm) = 56.1 (-OCH₃); 114.0, 115.4, 123.0 (tert. C), 113.2, 134.0, 148.5 (quart. C); C₇H₁₀BrClN₂O (253.53).

2-(9-Brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)essigsäure (**39**)

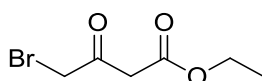


Zu einer Suspension aus *tert*-Butyl-2-(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)acetat (**23c**, 296 mg, 622 μ mol) in getrocknetem Dichlormethan (30 mL) wurde unter Stickstoffatmosphäre Trifluoressigsäure (2 mL) zugegeben. Nach 20 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch das Abdestillieren des Lösungsmittels unter vermindertem Druck abgebrochen. Zu dem resultierenden öligen Rückstand wurde Diethylether (3 mL) hinzugegeben und die Mischung 1 h refluxiert. Anschließend wurde der entstandene Niederschlag abgesaugt und einmal mit Diethylether gewaschen. Nach dem Trocknen konnten 132 mg farbloses Pulver isoliert werden (51% Ausbeute).

Zers.: 207-208 °C; IR (KBr): 3325 cm⁻¹ (NH), 1655 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO): δ (ppm) = 12.83 (*bs*, 1H, -OH), 12.01 (*s*, 1H, Indol-NH), 7.96 (*d*, 1H, ⁴*J*_{H,H} = 1.9 Hz, *H*_{arom.}), 7.73 (*d*, 1H, ³*J*_{H,H} = 8.4 Hz, *H*_{arom.}), 7.58 (*d*, 1H, ⁴*J*_{H,H} = 2.0 Hz, *H*_{arom.}), 7.50 (*dd*, 1H, ³*J*_{H,H} = 8.4 Hz, ⁴*J*_{H,H} = 2.1 Hz, *H*_{arom.}), 7.42 (*d*, 1H, ³*J*_{H,H} = 8.6 Hz, *H*_{arom.}), 7.30 (*dd*, 1H, ³*J*_{H,H} = 8.6 Hz, ⁴*J*_{H,H} = 1.9 Hz, *H*_{arom.}), 4.39 (*s*, 2H, -N⁵-CH₂), 3.99 und 3.11 (*bs*, 2H, Azepin-CH₂ (Aufnahme des Spektrums nahe der Koaleszenztemperatur; Übergang zwischen einem *s* zu zwei *d* erscheint als zwei *bs*)); ¹³C-NMR (100.6 MHz, *d*₆-DMSO): δ (ppm) = 31.0 (Azepin-CH₂), 52.3 (-N⁵-CH₂); 113.6, 120.7, 123.7, 124.9, 125.3, 128.7 (tert. C); 109.2, 111.9, 124.1, 127.8, 132.6, 133.0, 136.0, 140.6, 170.3, 170.7 (quart. C); C₁₈H₁₂BrClN₂O₃ (419.66); MS (EI):

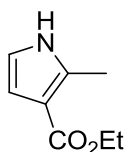
m/z (%) = 420 ($[M]^{+\bullet}$, 100), 391 ($[M-29 (-CHO)]^+$, 40), 361 ($[M-59 (-C_2H_3O)]^+$, 61); HRMS (EI): m/z $[M]^{+\bullet}$ ber. 417.97143, gef. 417.97144; HPLC (isokrat.): 98.2% bei 254 nm, 98.5% bei 280 nm, t_N = 3.99 min, t_M (DMSO) = 1.07 min (ACN/H₂O 50:50); λ_{max} : 234 nm, 318 nm, 398 nm.

γ -Bromacetessigsäureethylester¹⁰⁰ (47)



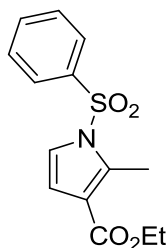
Zu einer Lösung aus Acetessigsäureethylester (3.90 mL, 29.9 mmol) und Bromwasserstoff (5 mL) in Eisessig (10 mL) wurde unter starkem Rühren eine Lösung aus Brom (3.40 mL, 65.6 mmol) in Eisessig (15 mL) langsam zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktionsmischung 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Aceton (50 mL) zum Ansatz hinzugegeben und weitere 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Als nächstes wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und der verbliebene Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel; Eluent: 100% Petrolether bis 9:1 Petrolether/Essigsäureethylester). Es konnten 3.55 g orange Flüssigkeit isoliert werden (57% Ausbeute).

¹H-NMR (600 MHz, *d*₆-DMSO): δ (ppm) = 4.56-4.60 (*m*, 2H, Ethyl-CH₂), 4.45 (*s*, 2H, -CH₂), 1.78 (*s*, 2H, -CH₂), 1.63-1.65 (*m*, 3H, Ethyl-CH₃); C₆H₉O₃Br (209.04).

Ethyl-2-methyl-1*H*-pyrrol-3-carboxylat ¹⁰⁵ (49a)

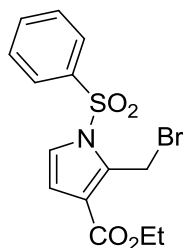
Vinylacetat (17.2 g, 199 mmol) wurde unter Stickstoffatmosphäre in getrocknetem Tetrachlorkohlenstoff (20 mL) gelöst und dazu eine Mischung aus Brom (31.7 g, 10.2 mL) in getrocknetem Tetrachlorkohlenstoff (10 mL) unter starkem Rühren langsam hinzuge tropft. Nach vollständiger Zugabe wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Acetessigsäureethylester (26 mL) aufgenommen und 10%ige wässrige Ammoniaklösung (200 mL) bei Raumtemperatur zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die wässrige Phase abdekantiert und die organische Phase mit Dichlormethan (200 mL) versetzt. Es wurde zweimal mit entionisiertem Wasser gewaschen, anschließend über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Aus dem öligen Rückstand fielen während der Lagerung bei 8 °C Kristalle aus. Diese wurden aus Toluol umkristallisiert, anschließend abgesaugt und mit wenig eisgekühltem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurden 8.99 g hellbraune Kristalle erhalten (30%).

Smp.: 74-75 °C (Lit.¹²⁶: 75 °C); IR (KBr): 3301 cm⁻¹ (NH), 1673 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.60 (s, 1H, Pyrrol-NH), 6.55-6.57 (m, 2H, -CH), 4.27 (q, 2H, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, -CH₂), 2.52 (s, 3H, -CH₃), 1.34 (t, 3H, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, -CH₃); ¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 13.0, 14.4 (prim. C); 59.3 (sek. C); 110.1, 115.9 (tert. C); 111.4, 135.3, 166.0 (quart. C); CHN: ber. C 62.73, H 7.24, N 9.14, gef. C 62.76, H 7.26, N 9.12; C₈H₁₁NO₂ (153.18).

Ethyl-2-methyl-1-(phenylsulfonyl)-1H-pyrrol-3-carboxylat ¹⁰⁴ (50)

Zu einer Lösung aus Ethyl-2-methyl-1H-pyrrol-3-carboxylat (**49a**, 1.53 g, 9.99 mmol) und Tetra-*n*-butylammoniumbromid (320 mg, 993 μ mol) in getrocknetem Toluol (50 mL) wurden Phenylsulfonylchlorid (2.64 g, 1.90 mL) und eine Lösung aus Natriumhydroxid (3.80 g) in entionisiertem Wasser (5 mL) hinzugegeben. Nach 5 h Rühren bei Raumtemperatur konnte mittels dünnschichtchromatographischer Untersuchungen kein weiterer Umsatz detektiert werden, und die Reaktion wurde durch Zugabe von entionisiertem Wasser (25 mL) abgebrochen. Die organische Phase wurde anschließend von der wässrigen getrennt, welche noch zweimal mit Toluol (je 50 mL) gewaschen wurde. Die vereinigten organischen Phasen wurden unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand aus einem Petrolether-Essigsäureethylester-Gemisch 15:2 umkristallisiert. Erhalten wurden 2.12 g Produkt (72% Ausbeute).

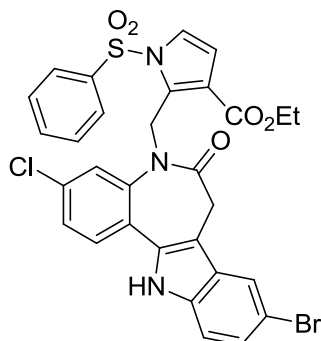
Smp.: 79-82 °C (kein Smp./Zers. In der Literatur¹⁰⁴ angegeben); IR (KBr): 1709 cm^{-1} (C=O), 1370 cm^{-1} (Sulfonamid); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.89-7.75 (*m*, 2H, *H*_{arom}), 7.72-7.59 (*m*, 1H, *H*_{arom}), 7.59-7.48 (*m*, 2H, *H*_{arom}), 7.32-7.25 (*m*, 1H, Pyrrol-CH), 6.63 (*d*, 1H, ³*J*_{H,H} = 3.5 Hz, Pyrrol-CH), 4.24 (*q*, 2H, ³*J*_{H,H} = 7.1 Hz, -CH₂), 2.62 (*s*, 3H, -CH₃), 1.31 (*t*, 3H, ³*J*_{H,H} = 7.1 Hz, -CH₃); ¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 12.0, 14.4 (prim. C); 60.2 (sek. C); 112.0, 121.0, 127.2 (2C), 129.6 (2C), 134.3 (tert. C); 117.7, 137.0, 138.5, 164.4 (quart. C); CHN: ber. C 57.32, H 5.15, N 4.77, gef. C 57.37, H 5.23, N 4.64; C₁₄H₁₅NO₄S (293.34).

Ethyl-2-(bromomethyl)-1-(phenylsulfonyl)-1H-pyrrol-3-carboxylat ¹⁰⁴ (51)

Zu einer Suspension aus 2-Methyl-1-(phenylsulfonyl)-1H-pyrrol-3-carboxylat (**50**, 2.13 g, 7.28 mmol) in frisch getrocknetem Tetrachlorkohlenstoff (30 mL) wurde *N*-Bromsuccinimid (2.16 g, 12.5 mmol) bei Raumtemperatur zugegeben. Anschließend wurde eine Spatelspitze Dibenzoylperoxid hinzugefügt und das Reaktionsgemisch 4 h bei 100 °C gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt und das Filtrat am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck destilliert. Der Rückstand wurde in Essigsäureethylester aufgenommen (250 mL) und zweimal mit gesättigter wässriger Natriumcarbonatlösung (je 200 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde anschließend noch einmal mit Essigsäureethylester extrahiert (200 mL) und die vereinigten organischen Phasen unter vermindertem Druck eingeeengt. Der ölige Rückstand wurde in wenig Diethylether aufgenommen, mit *n*-Hexan (tropfenweise) versetzt und im Ultraschallbad behandelt. Der dabei entstandene Niederschlag wurde abgesaugt und getrocknet. Erhalten wurden 1.87 g gelbe Kristalle (69% Ausbeute).

Smp.: 84-85 °C (kein Smp./Zers. In der Literatur ¹⁰⁴ angegeben); IR (KBr): 1708 cm⁻¹ (C=O), 1374 cm⁻¹ (Sulfonamid); ¹H-NMR (400 MHz, d₆-DMSO): δ (ppm) = 8.14-8.05 (*m*, 2H, *H*_{arom}), 7.86-7.79 (*m*, 1H, *H*_{arom}), 7.72-7.68 (*m*, 2H, *H*_{arom}), 7.67 (*d*, 1H, ³*J*_{H,H} = 3.5 Hz, Pyrrol-CH), 6.70 (*d*, 1H, ³*J*_{H,H} = 3.5 Hz, Pyrrol-CH), 5.17 (*s*, 2H, -CH₂), 4.24 (*q*, 2H, ³*J*_{H,H} = 7.1 Hz, -CH₂), 1.27 (*t*, 3H, ³*J*_{H,H} = 7.1 Hz, -CH₃); ¹³C-NMR (100.6 MHz, d₆-DMSO): δ (ppm) = 14.0 (prim. C); 21.5, 60.5 (sek. C); 112.8, 124.4, 127.4 (2C), 130.1 (2C), 135.4 (tert. C); 119.3, 135.4, 137.1, 162.3 (quart. C); C₁₄H₁₄BrNO₄S (372.24).

Ethyl-2-[(9-brom-3-chlor-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydrobenzo[2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-yl)methyl]-1-(phenylsulfonyl)-1*H*-pyrrol-3-carboxylat (**56**)

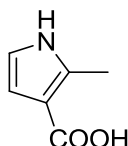


Nach AAV 2 unter Einsatz von 9-Brom-3-chlor-7,12-dihydroindolo-[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**20a**, 282 mg, 780 μ mol), Kalium-*tert*-butylat (122 mg, 1.09 mmol) und Ethyl-2-(brommethyl)-1-(phenylsulfonyl)-1*H*-pyrrol-3-carboxylat (**51**, 575 mg, 1.54 mmol) in getrocknetem Tetrahydrofuran (25 mL). Es wurde aus Ethanol umkristallisiert. Erhalten wurden 226 mg hellgelbes Pulver (49% Ausbeute).

Zers.: ab 164 °C; IR (KBr): 3356 cm^{-1} (NH), 1672 cm^{-1} (C=O), 1598 cm^{-1} (C=O), 1343 cm^{-1} (Sulfonamid); ^1H -NMR (600 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = 11.96 (s, 1H, Indol-NH), 7.94 (d, 1H, $^4J_{\text{H,H}} = 1.9$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.82 (dd, 2H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.5$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 1.2$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.78-7.72 (m, 1H, $H_{\text{arom.}}$), 7.66-7.55 (m, 3H, $H_{\text{arom.}}$), 7.53 (d, 1H, $^4J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.39 (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.33 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7.29-7.23 (m, 2H, H_{arom} und Pyrrol-CH), 6.41 (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 3.5$ Hz, Pyrrol-CH), 5.52 und 5.47 (d, 2H, $^2J_{\text{H,H}} = 14.6$ Hz, -N⁵-CH₂ (durch sterische Einschränkung der Umwandlung zwischen den Konformeren sind enantiotope Methylenprotonen chemisch inäquivalent)), 4.00 und 3.09 (d, 2H, $^2J_{\text{H,H}} = 14.3$ Hz, Azepin-CH₂ (durch sterische Einschränkung der Umwandlung zwischen Konformeren sind enantiotope Methylenprotonen chemisch inäquivalent)), 3.82 und 3.59 (b, 2H, -OCH₂), 1.02 (t, 3H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, -CH₃); ^{13}C -NMR (150.9 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = 13.7 (-CH₃); 31.6, 39.5, 60.1 (sek. C); 111.5, 112.7, 120.6, 123.9, 124.5, 125.2, 125.3, 126.7 (2C), 130.1 (2C), 132.9, 135.2 (tert. C); 109.3, 113.4, 121.2, 125.5, 128.0, 128.5, 131.2, 132.7, 135.8, 137.3, 137.4,

162.5, 170.6 (quart. C); $C_{30}H_{23}BrClN_3O_5S$ (652.94); MS (EI): m/z (%) = 653 ($[M]^{+\bullet}$, 55), 512 ($[M-141 (-C_6H_5O_2S)]^+$, 100); HRMS (EI): m/z $[M]^{+\bullet}$ ber. 651.02248, gef. 651.02145; HPLC (isokrat.): 98.5% bei 254 nm, 98.4% bei 280 nm, t_N = 5.07 min, t_M (DMSO) = 1.07 min (ACN/H₂O 70:30); λ_{max} : 235 nm, 319 nm, 400 nm; HPLC (grad.): 95.0% bei 254 nm, t_N = 13.87 min, t_M (DMSO) = 1.07 min (Zeit: ACN/H₂O; 0 min: 10/90; 10 min: 70/30; 10.5 min: 90/10; 22 min: 90/10).

2-Methyl-1*H*-pyrrol-3-carbonsäure (61)



Ein Gemisch aus Ethyl-2-methyl-1*H*-pyrrol-3-carboxylat (**49a**, 1.62 g, 10.5 mmol) und Kaliumhydroxid (1.30 g, 22.4 mmol) in entionisiertem Wasser (18 mL) wurde 3 h bei 100 °C gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und durch Zugabe von konzentrierter Salzsäure auf pH = 1 angesäuert. Der dabei entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mit entionisiertem Wasser gewaschen. Der Filterkuchen wurde aus Petrolether umkristallisiert. Nach dem Trocknen konnten 826 mg kristallines, hellbraunes Produkt erhalten werden (62% Ausbeute).

Zers.: ab 157 °C (Lit.¹²⁷: 178-179 °C); 1H -NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = 11.13 (s, 1H, -OH), 6.57-6.59 (m, 1H, -CH), 6.31 (m, 1H, -CH), 3.67 (bs, 1H, -NH), 2.40 (s, 3H, -CH₃); ^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 12.9 (prim. C); 109.6, 115.9 (tert. C); 116.2, 134.8, 166.8 (quart. C); $C_6H_7NO_2$ (125.13).

7.4 Biologische Testungen

Die biologischen Untersuchungen an *T. brucei brucei* und den Trypanothion-synthetasen sowie die Expression dieser Enzyme in *E. coli* wurden von Herrn D. Benítez, Herrn D. Charquero und Herrn M. A. Comini aus der Gruppe *Redox Biology of Trypanosomes* des Instituts Pasteur de Montevideo in Uruguay durchgeführt. Sofern nicht anders erwähnt, wurden die verwendeten Reagenzien in analytischer Qualität eingesetzt und von Sigma-Aldrich erworben. Die Zytotoxizitätsmessungen an Mausmakrophagen und die Messungen an *T. cruzi*-Epimastigoten wurden von Frau M. Abad Dar, Frau H. Erdmann und Herrn C. Hölscher aus der Forschungsgruppe Infektionsimmunologie des Forschungszentrums in Borstel übernommen.

7.4.1 Zytotoxizitätsmessungen

Gewinnung und Kultivierung von Mausmakrophagen

Zunächst wurden *femur* und *tibiae* aus der Maus entnommen. Diese wurden von Gewebsresten gesäubert und mit Plutznik-Medium (DMEM (high Glucose) (260 mL), 10% FCS (50 mL), 5% Pferdeserum (25 mL), 30% L929 Überstand (150 mL), 2 mM L-Glutamin (5 mL), 1% P/S (5 mL), 1 mM Na-Pyruvat (5 mL), 100 µM 2-ME (500 µL)) durchspült. Die extrahierten Zellen wurden mit Medium gewaschen und gezählt (Verwendung von Türks-Lösung zum Anfärben, Neubauer *counting*). Je 10 mL der Plutznik-Lösung wurden in Petrischalen vorgelegt, pro Schale 3×10^6 Zellen ausgesät und bei 37 °C und 5% CO₂ insgesamt 7 Tage inkubiert, wobei nach 3 Tagen je 10 mL neues Medium pro Petrischale nachgegeben wurden. Am Tag 7 wurde das überstehende Medium abgesaugt und die Petrischale mit 5 mL warmer PBS gespült. Zum Ablösen der Makrophagen von der Petrischale wurden jeweils 3 mL Accutase hinzugegeben und das Gemisch weitere 5 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend konnten die Zellen abgespült, extrahiert und in 10 mL DMEM/10% FCS/1% LG/1% PS aufgenommen und gezählt werden (Verwendung von Trypanblau zum Anfärben, Neubauer *counting*).

Durchführung der Zytotoxizitätsmessungen an Mausmakrophagen am xCELLigence

Gemessen wurde die elektrische Impedanz pro Kavität in einem xCELLigence-Gerät der Firma Roche. Zur Auswertung wurde das Programm RTCA Software 1.2.1. herangezogen. Für Messungen am xCELLigence wurden besondere *E-Plates* benötigt, bei welchen in jeder Kavität Elektroden zur Messung der elektrischen Impedanz eingebaut sind. Eingesetzt wurde die *E-Plate* VIEW 96 von Roche. Als erstes wurden 50 µL Plutznik Medium pro Kavität eingefüllt und mittels einminütiger Kontrollmessung im xCELLigence die Funktionstauglichkeit der Elektroden geprüft. Zu den 50 µL Plutznik Medium wurden anschließend 7.5×10^4 Zellen/50 µL/Kavität ausgesät und 4-12 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ vermessen. Der gemessene Zellindex, also die relative Änderung der gemessenen Impedanz in der Kavität, sollte konstant sein, bevor Testsubstanzen hinzugegeben werden. Die in DMSO gelösten Testsubstanzen wurden mit Plutznik-Medium so verdünnt, dass 25 µL Plutznik Medium/Testsubstanzlösung zugegeben wurde. Der maximale DMSO-Gehalt pro Kavität betrug 0.1%. Als Negativkontrolle wurde LPS 10 ng/mL, als Positivkontrolle Staurosporin (3 µM) eingesetzt. Zudem wurden Kontrolluntersuchungen mit 0.1% DMSO, ohne Testsubstanzen und mit 100% Medium (ohne Zugabe von Makrophagen) durchgeführt. Zuletzt wurden alle Kavitäten mit Plutznik-Medium auf ein Endvolumen von 200 µL pro Kavität aufgefüllt. Im xCELLigence wurden bei 37 °C und 5% CO₂ die ersten 100 Messwerte alle 15 min aufgezeichnet, anschließende Messwerte alle 30 min. Die Messdauer nach Zugabe der zu testenden Substanzen betrug 24 h. Es wurden Doppel- oder Dreifachbestimmungen durchgeführt. Für die Auswertung der Messungen wurde der Zellindex der Medium-Kontrolle zum Zeitpunkt 48 h gleich 100% gesetzt und die Indices der Testsubstanzen beim Zeitpunkt 48 h darauf bezogen. Das Ergebnis entspricht der Vitalität in %. Die Zytotoxizität ergibt sich anschließend aus folgender Rechnung: $100\% - \%Vitalität = Zytotoxizität$.

Durchführung der Vitalitäts-/Proliferationsuntersuchungen an *T. cruzi* mittels MTT-Assay

Axenische *T. cruzi*-Epimastigoten des Y-Stamms wurden bei 28 °C in LIT-Medium (4.0 g NaCl, 0.4 g KCl, 8.0 g Na₂HPO₄, 2.0 g Glucose, 5.0 g Tryptose Brühe in 850 mL Braun Wasser lösen; Zugabe von: 5 mL Hermin-Lösung, 50 mL Leberpulver-Lösung, 100 mL FCS) kultiviert und davon je 900 µL pro Kavität (3 x 10⁶ Epimastigoten/mL) in 24-well-Platten (Nunc delta surface, Thermo scientific Nunc) ausgesät. Danach wurden die Testsubstanzen zugegeben (in DMSO gelöst; max. DMSO-Konzentration pro Kavität von 0.1%) und 72 h bei 28 °C kultiviert. Anschließend wurden pro Kavität 100 µL einer 2.5 mg/mL MTT-PMS Lösung (45 mg MTT (4 °C, Sigma), 3.96 mg PMS (-20 °C, Sigma), 18 mL D₂O) zugegeben und die Platten bei 28 °C für 75 min inkubiert. Die entstandenen Formazankristalle wurden durch Zugabe von 1 mL 10%iger SDS-Lösung in 0.01M HCl-Lösung innerhalb von 30 min bei RT gelöst und in dieser Form bei 595 nm photometrisch detektiert. Von allen Konzentrationen der zugesetzten Testsubstanzen wurden Doppelmessungen angefertigt, Kontrollen mit Nifurtimox (11 µM), DMSO (0.1%) und reinem Medium wurden immer mit durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Zusammenfassung der Ergebnisse der MTT-Testungen an *T. cruzi*-Epimastigoten zur Bestimmung der antiproliferativen Eigenschaften der Testsubstanzen.

Verbindung		Konzentration [µM]		
20a		56.13	28.07	14.03
	Inhibition [%]	8.01	11.68	15.07
20b		62.27	31.14	15.57
	Inhibition [%]	17.85	31.09	24.14
20c		8.79	4.40	2.20
	Inhibition [%]	7.29	6.84	6.06
20d		59.27	29.63	14.82
	Inhibition [%]	10.18	9.68	-4.56
20e		28.44	14.22	7.11
	Inhibition [%]	11.51	5.51	1.39
23a		48.28	24.14	12.07
	Inhibition [%]	47.39	31.26	24.86
23b		48.69	24.35	12.17
	Inhibition [%]	54.95	35.43	22.25

Verbindung		Konzentration [μM]		
23c		43.68	21.84	10.92
	Inhibition [%]	59.68	49.89	44.38
24a		41.23	20.62	10.31
	Inhibition [%]	-7.20	-6.30	-5.81
24b		39.66	19.83	9.92
	Inhibition [%]	-23.49	-10.98	-11.61
		4.68	2.34	1.17
	Inhibition [%]	7.37	8.08	7.33
24c		41.01	20.51	10.25
	Inhibition [%]	57.46	26.70	9.94
		9.26	4.76	2.38
	Inhibition [%]	4.14	-2.60	-4.95
24d		41.04	20.52	10.26
	Inhibition [%]	35.10	1.66	3.78
		8.88	4.44	2.22
	Inhibition [%]	-5.99	-2.79	-2.52
24e		42.48	21.24	10.62
	Inhibition [%]	2.45	3.94	1.92
24f		47.09	23.54	11.77
	Inhibition [%]	41.60	26.92	13.85
24h		17.01	8.50	4.25
	Inhibition [%]	-5.51	-8.57	-5.34
		6.97	3.49	1.74
	Inhibition [%]	26.73	13.07	5.83
24i		35.77	17.89	8.94
	Inhibition [%]	-2.02	-0.98	-0.20
		7.26	3.63	1.82
	Inhibition [%]	-7.06	-3.95	0.61
24m		42.03	21.02	10.51
	Inhibition [%]	6.78	5.38	3.52
		8.19	4.09	2.05
	Inhibition [%]	2.79	-0.86	6.08
28		50.04	25.02	12.51
	Inhibition [%]	16.69	19.47	-12.35
30		41.66	20.83	10.41
	Inhibition [%]	40.49	37.76	30.70
39		50.99	25.50	12.75
	Inhibition [%]	16.69	19.24	17.02
56		32.96	16.48	8.24
	Inhibition [%]	47.33	39.93	22.64

Durchführung der Vitalitäts-/Proliferationsuntersuchungen an *T. brucei brucei* mittels Durchflusszytometrie

Die biologische Aktivität der synthetisierten Verbindungen wurde an der infektiösen Form des *T. b. brucei*-Stammes 427 (Zelllinie 449) getestet¹²⁸. Die Parasiten wurden in HMI-9-Medium¹²⁹ angereichert mit 10% (v/v) fetalem Kälberserum (FCS) (PAA), 10 U/mL Penicillin (Gibco®), 10 µg/mL Streptomycin (Gibco®), 0.2 µg/mL Phleomycin (Gibco®) und 5 µg/mL Hygromycin (Invitrogen), in einem befeuchteten Inkubator (Thermo SCIENTIFIC) bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert. Abhängig von der Löslichkeit der Verbindungen wurden Stammlösungen von 3-24 mM in DMSO hergestellt. Daraus wurden durch Verdünnung mit DMSO geringer konzentrierte Lösungen hergestellt. Die mittels Zentrifugation der kultivierten infektiösen Parasiten (*mid-exponential phase*, ~2 Millionen Zellen/mL, 2000 x *g* für 10 min bei RT) erhaltenen Trypanosomen-Tablette wurden in frischem Kulturmedium auf eine Konzentration von 5 x 10⁵ Zellen/mL resuspendiert. 2 µL der Stammlösungen bzw. DMSO (Proliferationskontrolle) wurden in die Kavitäten einer 96-well-Platte (Corning Incorporated, costar® 3599) gegeben. Im Anschluss wurden je 200 µL der Zellsuspension in jede Kavität gegeben und die befüllte Platte bei 37 °C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert. Nach 24 h wurden je 100 µL aus jeder Kavität in jeweils ein 1.1 mL Probengefäß (T100, Biotube™ System) gegeben und mit 200 µL sterilem Phosphatpuffer pH = 7.0 mit 1 % (w/v) Glucose verdünnt. 2 µL des Farbstoffs Propidiumiodid (PI) wurde in einer Konzentration von 200 mg/mL in jedes Probengefäß hinzugegeben und die Mischung durch *vortexing* homogenisiert. Vermessen wurden die Proben an einem CyAn™ ADP (DakoCytomation) Durchflusszytometer. Zur Durchführung der Durchflusszytometrie wurde ein 488 nm Festkörperlaser als anregende Lichtquelle eingesetzt. Die Zellen wurden mittels Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) detektiert, die Fluoreszenz von PI bei $\lambda_{em} = 613-630$ nm aufgenommen. Die Signale wurden logarithmisch mit Hilfe von Verstärkern detektiert. Alle Messungen wurden bei einem konstanten Fluss und für eine Messdauer von 60 Sekunden pro Probe durchgeführt. Zur Analyse der Daten wurde die Software Summit (Dako) und Flow-Jo (FLOWJO) verwendet. Die Positivkontrolle mit Nifurtimox (Lampit® von Bayer) wurde unter Verwendung der EC₅₀-Konzentration (15 µM) durchgeführt. Alle Proben und Kontrollen wurden dreifach bestimmt. Die EC₅₀-Werte wurden aus Dosis-Wirkungs-Kurven ermittelt, die

an sigmoidale Boltzmann-Funktionen angepasst oder aus nicht linearen Ausgleichskurven extrapoliert wurden.

Tabelle 14: Übersicht der Ergebnisse der Durchflusszyometrie zur Bestimmung des *T. b. brucei*-Parasitenwachstums^{a)} in % unter Einfluss der Testverbindungen.

Verbindung	Parasiten- wachstum [%]	n*	c* [μM]	Verbindung	Parasiten- wachstum [%]	n*	c* [μM]
20a	12.9±0.4	2	30	24d	14.0±2.6	2	5
20b	14.2±3.2	2	30	24e	2.2±0.1	2	5
20c	77.8±4.5	2	30	24f	3.9±0.4	3	5
20d	21.4±2.0	2	30	24h	0.8±0.1	3	5
20e	102.2±8.4	2	5	24k	4.3±4.0	2	5
23a	5.1±0.2	2	5	24l	5.5±0.2	2	5
23b	2.6±0.6	2	5	24m	35.4±0.4	2	5
23c	1.2±0.5	3	5	28	4.1±0.0	2	5
24a	13.9±2.2	2	5	30	4.0±0.6	2	5
24b	1.9±0.4	2	5	39	61.2±8.1	2	30
24c	19.4±0.0	2	5	56	0.8±0.2	3	5

Erläuterung: ^{a)} Mittelwerte ± Standardabweichung; * n = Anzahl der Messungen;
c = eingesetzte Konzentrationen.

7.4.2 Expression, Reinigung und Aktivitätsassay der Trypanothionsynthetasen (*L*TryS, *Tb*TryS und *Tc*TryS)

Die Trypanothionsynthetasen (TryS) der drei Trypanosomatidspezies wurden als rekombinante Formen mit N-terminalem His-tag produziert. pET-15b *Tb*TryS⁵⁹ (ein Geschenk von Dr. Alan Fairlamb, Dundee University, Schottland), pRSET-A *Tc*TryS (ein Geschenk von Dr. Sergio Guerrero, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentinien) und pET-28a *L*TryS (freundlicherweise bereitgestellt von Dr. Helena Castro, Institute for Molecular and Cell Biology, Porto, Portugal) wurden verwendet, um jeweils die TryS von *Trypanosoma brucei brucei* (Gen BankTM Identifizierungsnummer CAC87573.1.), *T. cruzi* strain Tulahuen 0 (GenBankTM Identifizierungsnummer AY155571.1) und *L. infantum* (GenBankTM Identifizierungsnummer CAM69145.1^{a 130}) zu exprimieren. Die *Escherichia coli* Stämme BL21(DE3) und Tuner (DE3) dienten als Expressionswirte für *Tc*TryS und *Tb*TryS bzw. *L*TryS. Starterkulturen für jedes Wirts-Expressions-System bestanden aus frisch gewonnenen Zellen in LB-Medium versetzt mit einem jeweils entsprechenden selektiven Antibiotikum (100 µg/mL Ampicillin für pET-15b *Tb*TryS, pRSET-A für *Tc*TryS, und 50 µg/mL Kanamycin für pET28a *L*TryS). Die Zellkulturen wuchsen über Nacht unter Luftatmosphäre bei 37 °C und 180 rpm. In 2 L Erlenmeyerkolben wurden zu 500 mL Terrific Broth Medium, versetzt mit 10 g/L Glucose und Antibiotika in den oben angegebenen Konzentrationen, 5 mL der Starterkulturen hinzugegeben. Die Kolben wurden bei 37 °C und 180 rpm inkubiert bis die Kulturen eine optische Dichte bei 600 nm von 0.8-1.0 erreichten. Anschließend wurden sie bei 4 °C für 15 min stehen gelassen. Die Expression der rekombinanten Proteine wurde durch die Zugabe von 0.5 mM Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid induziert. Die Kultivierung wurde für weitere 5 h bei 25 °C und 180 rpm wieder aufgenommen. Bakterien, welche die *Tc*TryS exprimierten, wurden daran anschließend für weitere ~ 13 h kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4 000 x g für 15 min bei 4 °C (Zentrifuge Sorvall RC-6, Thermo Fisher Scientific) geerntet und in einem Gemisch bestehend aus 50 mM NaH₂PO₄ pH = 7.2, 300 mM NaCl und 10 mM

^a Die Codierungssequenz der *L*TryS weist zwei Punktmutationen an den Basennummern 307 (C to T) und 1338 (C to T) auf, wobei es sich bei der Letzteren um einen stillen Austausch handelt. Erstere generiert einen Aminosäureaustausch von Pro zu Ser an der Position 103, welche in der variablen Region der Amidasedomäne des Proteins lokalisiert ist. Vorläufige kinetische Charakterisierungen der *L*TryS zeigen, dass diese Mutation die kinetischen Parameter der Synthetaseaktion nicht beeinflussen (Benítez et al. unveröffentlicht).

Imidazol (Puffer A) mit einem Verhältnis von 1 g Nassgewicht-Pellet auf 5 mL Puffer resuspendiert. Die Zelllyse wurde bewerkstelligt, indem das Gemisch für eine Stunde bei 4 °C mit Lysozym geschüttelt (30 mg % w/v) und anschließend im Ultraschallbad auf Eis behandelt wurde (4 Pulse in 30 Sekunden unterbrochen von Pausen mit einer Dauer von 60 Sekunden; Digital Sonifier 450 von Branson). Die Lysate wurden zweimal bei 20 000 x g für 20 min bei 4 °C (Zentrifuge Sorvall RC-6, Thermo Fisher Scientific) zentrifugiert um Verunreinigungen zu entfernen. Der Überstand, welcher das lösliche Protein beinhaltete, wurde filtriert (0.7 µM Filter) und anschließend über eine mit Puffer A gepackte 1 mL HisTrap Fast Flow Säule (GE Healthcare) aufgereinigt. Die Säule wurde zunächst mit Puffer A mit 25 mM Imidazol gewaschen. Das rekombinante Protein konnte mittels isokratischer Elution mit 10 mL Puffer B (Puffer A mit 500 mM Imidazol) erhalten werden. Die Chromatographie wurde bei 4 °C mit einer Flussrate von 1.0 mL/min unter Verwendung einer Schlauchpumpe (TRIS Teledyne ISCO) durchgeführt. Homogene, aktives Protein beinhaltende Fraktionen wurden zusammengefasst und mit einem 30 kDa *cut-off* Amicon Filter (Millipore) konzentriert. Alle rekombinanten TryS-Proteine wurden einem zweiten Reinigungsschritt durch eine Größenausschlusschromatographie (SEC) unterzogen. Verwendet wurde Superdex™ 200 10/300 GL (GE Healthcare) als stationäre Phase und der Reaktionspuffer (siehe Aktivitätsassay) mit Zugabe von 150 mM NaCl als Laufmittel. Die eluierten Fraktionen mit homogenem, aktivem Protein wurden zusammengegeben. Der finale Aufreinigungsschritt für *TcTryS* und *TbTryS* bestand in einer Anionenaustauschchromatographie unter Verwendung einer MonoQ HR 5/5 Säule (GE Healthcare). Vor der Injektion in die MonoQ Säule wurden die Proteinproben über eine PD-10 Säule (Sephadex G25 matrix; GE Healthcare) entsalzt und in Reaktionspuffer aufgenommen. Anschließend konnte die entsalzte TryS auf die mit Reaktionspuffer gepackte MonoQ Säule gegeben werden. Die Säule wurde mit Reaktionspuffer gewaschen, bis sich die Absorption bei 280 nm auf einer Basislinie eingependelt hatte. Anschließend konnten die Proteine mit einem linearen Gradienten von 0 bis 500 mM NaCl im Reaktionspuffer eluiert werden. Die zwei zuletzt aufgeführten Chromatographien wurden bei Raumtemperatur mit Hilfe einer Äkta-FPLC Apparatur (GE Healthcare) durchgeführt. Die Proteinreinheit wurde nach jedem Aufreinigungsschritt mit SDS-PAGE 12 % Gel unter reduzierenden Bedingungen getestet. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels *Bicinconinic Acid* Assay unter Verwendung von Kälberserum Albumin als Standard bestimmt. Die oben

aufgeführten Protokolle lieferten ~1-1.5 mg rekombinantes Protein pro Liter des Kulturmediums mit einer Reinheit von $\geq 95\%$. Die Proteine wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Reaktionspuffer angereichert mit 40 % (v/v) Glycerol (Carlo Erba Reagents SA) gelagert. Über eine Zeitdauer von 3 Monaten wurde kein signifikanter Aktivitätsverlust verzeichnet.

Der finale TryS Aktivitätsassay basiert auf der Bestimmung von aus ATP bei der TryS Katalyse abgespaltenem anorganischem Phosphat mittels Malachitgrün (BIOMOL GREEN™ Enzo® Life Sciences). Dieser Farbstoff komplexiert die abgespaltene Phosphatgruppe zu einem grünen Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 650 nm. Der Reaktionspuffer besteht aus 100 mM HEPES-K pH 7.4, 0.5 mM EDTA, 10 mM MgSO_4 und 5 mM DTT. Die Master Mix (MM) Lösungen beinhalten Substrate in den Konzentrationen, die den in der Literatur angegebenen intrazellulären Konzentrationen der jeweiligen Trypanosomatiden entsprechen^{10, 49, 131-134}. Die kinetischen Parameter wurden aus der Literatur^{10, 59} entnommen bzw. von Benítez et al. (unveröffentlicht) für *L*TryS und *Tc*TryS ermittelt und entsprechend eingestellt. Demzufolge wurde die Spermidinkonzentration für alle Enzyme bei 2 nM fixiert, wohingegen die Glutathionkonzentration variierte (570 μM , 250 μM und 50 μM jeweils für *Tc*TryS, *L*TryS und *Tb*TryS). Die ATP Konzentration wurde auf 150 μM eingestellt. Die Assays wurden bei Raumtemperatur unter Verwendung von 96-well-Platten (Corning Incorporated, costar® 3590) mit einem Gesamtvolumen von 50 μL (40 μL der MM Lösung, 5 μL der in DMSO gelösten Testverbindungen (J.T. Baker) und 5 μL Enzymlösung (*Tc*TryS: 92 nM, ~ 0.200 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$; *Tb*TryS: 230 nM, ~ 0.070 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$; *L*TryS: 160-270 nM, ~ 0.11-0.15 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$) durchgeführt. Eine Reaktionskontrolle wurde unter Zugabe von 5 μL DMSO ohne Testverbindung angefertigt. Für jedes Enzym wurden Inhibitionskontrollen unter Zugabe von 5 μL bekannter Inhibitoren in deren jeweiligen IC_{50} -Konzentrationen (30 μM der Verbindung Mol2008, 350 nM von Verbindung FS554 und 2.82 mM GSH jeweils für *Tb*TryS, *L*TryS und *Tc*TryS) durchgeführt. Für alle getesteten Verbindungen und alle Kontrollen wurden zudem Testversuche ohne Enzymzugabe angesetzt. Testsubstanzen, Kontrollen und Kontrollen ohne Enzymzugabe wurden jeweils viermal getestet. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Enzym initiiert (im Falle der Kontrollen ohne Enzymzugabe wurde Reaktionspuffer hinzugefügt) und nach 15 min durch Zugabe von 200 μL BIOMOL GREEN™ Reagenz gestoppt.

Nach einer Entwicklungszeit von 20 min wurde die Absorption bei 650 nm mit einem MultiScan EX Plattenleser (Thermo SCIENTIFIC) vermessen. Die IC₅₀-Werte wurden aus Dosis-Wirkungs-Kurven ermittelt, welche mittels der sigmoidalen Boltzmann-Gleichung gefittet oder aus nichtlinearen Plots extrapoliert wurden.

Tabelle 15: Übersicht der inhibitorischen Aktivitäten^{a)} der Testverbindungen in einer Konzentration von 30 µM bzw. der IC₅₀-Werte.

Verbindung	<i>TbTryS</i> Aktivität [%]	n (<i>TbTryS</i>)*	<i>LTryS</i> Aktivität [%] bzw. IC ₅₀ [µM]	n (<i>LTryS</i>)*
20a	106.8±6.7	4	98.3±7.8%	3
20b	98.0±3.1	3	87.9±7.1%	3
20c	105.0±7.4	4	86.9±3.3%	3
20d	91.4±5.5	3	73.9±2.0%	3
20e	87.8±6.0	4	50.7±4.9%	3
23a	82.9±4.0	4	3.0±0.7 µM	-
23b	70.2±5.5	4	62.7±7.0%	3
23c	102.6±1.6	3	2.4±0.3 µM	-
24a	47.6±7.0	5	50.8±5.6%	3
24b	45.2±4.1	4	50.0±4.0%	3
24c	68.4±6.0	4	0.40±0.07 µM	-
24d	95.7±3.8	3	2.8±0.7 µM	-
24e	80.1±2.5	3	61.4±1.3%	2
24f	90.2±2.8	4	0.52±0.20 µM	-
24h	81.3±1.9	3	53.0±2.4%	3

Verbindung	<i>TbTryS</i> Aktivität [%]	n (<i>TbTryS</i>)*	<i>LfTryS</i> Aktivität [%] bzw. IC ₅₀ [μM]	n (<i>LfTryS</i>)*
24k	50.2±3.8	5	0.31±0.03 μM	-
24l	71.1±3.2	4	63.3±5.9%	3
24m	72.7±5.9	4	0.27±0.02 μM	-
28	91.7±5.8	4	4.0±0.5	-
30	103±9.1	3	73.1±2.5%	3
39	116±6.8	4	102.0±16.0%	4
56	86.6±8.6	3	70.6±12.7%	4

Erläuterung: ^{a)} Mittelwerte ± Standardabweichung; Erläuterungen * n = Anzahl der Messungen.

8 Literaturverzeichnis

1. DNDi: Drugs for neglected diseases initiative. <http://www.dndi.org/> (abgerufen am 08.04.2013).
2. WHO: World health statistics. **2013**, Genf, Schweiz, S. 16.
3. Zhou, L., Stewart, G., Rideau, E., Westwood, N. J., Smith, T. K.: A class of 5-nitro-2-furancarboxylamides with potent trypanocidal activity against *Trypanosoma brucei* in vitro. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 796-806.
4. Stich, A.: Eine alte Bedrohung kehrt zurück: Die afrikanische Schlafkrankheit. *Pharm. Unserer Zeit* **2009**, 38, 546-550.
5. Schurigt, U., Moll, H.: Wirkstoffsuche und Entwicklung von Vakzinierungsstrategien zur Behandlung und Prophylaxe der kutanen Leishmaniose. *Pharm. Unserer Zeit* **2009**, 38, 532-537.
6. Schlitzer, M.: Im letzten Jahrhundert entwickelt: Wirkstoffe zur Behandlung der afrikanischen Schlafkrankheit. *Pharm. Unserer Zeit* **2009**, 38, 552-558.
7. Ryczak, J., Kunick, C.: Antimon und mehr: Wirkstoffe zur Behandlung von Leishmaniosen. *Pharm. Unserer Zeit* **2009**, 38, 538-544.
8. Krauth-Siegel, R. L., Bauer, H., Schirmer, R. H.: Dithiolproteine als Hüter des intrazellulären Redoxmilieus bei Parasiten: alte und neue Wirkstoff-Targets bei Trypanosomiasis und Malaria. *Angew. Chem.* **2005**, 117, 698-724.
9. Cavalli, A., Bolognesi, M. L.: Neglected tropical diseases: multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 7339-7359.
10. Torrie, L. S., Wyllie, S., Spinks, D., Oza, L. S., Thompson, S., Harrison, J. R., Gilbert, I. H., Wyatt, P. G., Fairlamb, A., Frearson, J. A.: Chemical validation of trypanothione synthetase; A potential drug target for human trypanosomiasis. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 36137-36145.
11. DNDi: Leishmaniasis. <http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/vl.html> (abgerufen am 24.06.2013).

12. WHO: Neglected tropical diseases in the world today. Part 2. Leishmaniasis. **2013**, Genf, Schweiz, S. 91-96.
13. Wong, I. L. K., Chan, T. H., Chow, L. M. C.: Flavonoid dimers as novel, potent antileishmanial agents. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8891-8902.
14. Schuster, F. L., Sullivan, J. J.: Cultivation of clinically significant homoflagellates. *Clin. Microbiol. Rev.* **2002**, *15*, 374-389.
15. Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., Zinkernagel, R. M.: Medizinische Mikrobiologie: Verstehen - Lernen - Nachschlagen. 9. Aufl., **1998**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 486 ff.
16. CDC: Center for Disease Control and Prevention, Leishmaniasis. <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html> (abgerufen am 24.06.2013).
17. Ryczak, J.: Neue Paullone als Wirkstoffe gegen Leishmanien und Trypanosomen. Dissertation Technische Universität Braunschweig, **2012**, S. 5 ff.
18. Simoes de Carvalho de Sousa, A. F.: Investigation of trypanothione synthetase of *Leishmania infantum* as a potential target for new antiparasitic drugs. Dissertation Universität Lissabon, **2011**, S. 3-5.
19. Mehlhorn, H., Peters, W.: Diagnose der Parasiten des Menschen, einschließlich der Therapie einheimischer und tropischer Parasitosen. 1. Aufl., **1983**, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, S. 74-76.
20. Schmidt, A., Krauth-Siegel, R. L.: Enzymes of the trypanothione metabolism as targets for antitrypanosomal drug development. *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*, 1239-1259.
21. Piacenza, L., Zago, M. P., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Basombrio, M. A., Radi, R.: Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. *Int. J. Parasitol.* **2009**, *39*, 1455-1464.
22. CDC: Center for disease control and prevention, chagas. <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html> (abgerufen am 24.06.2013).
23. Pan, P., Vermelho, A. B., Rodrigues, G. C., Scozzafava, A., Tolvanen, M. E. E., Parkkila, S., Capasso, C., Supuran, C. T.: Cloning, characterization, and sulfonamide and thiol inhibition studies of an α -carbonic anhydrase from *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of chagas disease. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1761-1771.
24. DNDi: Chagas. <http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/chagas.html> (abgerufen am 24.06.2013).
25. Paes, M. C., Cosentino-Gomes, D., Fernandes de Souza, C., Pereira de Almeida Nogueira, N., Meyer-Fernandes, J. R.: The role of heme and reactive

oxygen species in proliferation and survival of *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasit. Res.* **2011**, 1, 1-8.

26. WHO: Neglected tropical diseases in the world today. Part 2. Chagas disease. **2013**, Genf, Schweiz, S. 75-81.

27. Papadopoulou, M. V., Bloomer, W. D., Rosenzweig, H. S., Chatelain, E., Kaiser, M., Wilkinson, S. R., McKenzie, C., Ioset, J.-R.: Novel 3-nitro-1*H*-1,2,4-triazole-based amides and sulfonamides as potential antitrypanosomal agents. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 5554-5565.

28. Olin-Sandoval, V., González-Chávez, Z., Berzunza-Cruz, M., Martinez, I., Jasso-Chávez, R., Becker, I., Espinoza, B., Moreno-Sánchez, Saavedra, W.: Drug target validation of the trypanothione pathway enzymes through metabolic modelling. *FEBS Journal* **2012**, 279, 1811-1833.

29. Irigoín, F., Cibils, L., Comini, M. A., Wilkinson, S. R., Flohé, L., Radi, R.: Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Radical Biol. Med.* **2008**, 45, 733-742.

30. Andriani, G., Amata, E., Beatty, J., Clements, Z., Coffey, B. J., Courtemanche, G., Devine W., Erath, J., Juda, C. E., Wawrzak, Z., Wood, J. T., Lepesheva, G. I., Rodriguez, A., Pollastri, P.: Antitrypanosomal lead discovery: identification of a ligand-efficient inhibitor of *Trypanosoma cruzi* CYP51 and parasite growth. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 2556-2567.

31. CDC: Center for Disease Control and Prevention, sleeping sickness. <http://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/biology.html> (abgerufen am 24.06.2013).

32. WHO: Neglected tropical diseases in the world today. Part 2. Human african trypanosomiasis. **2013**, Genf, Schweiz, S. 82-90.

33. Heby, O., Persson, L., Rentala, M.: Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of african sleeping sickness, chagas' disease, and leishmaniasis. *Amino Acids* **2007**, 33, 359-366.

34. del Carmen Figarella Araujo, K.: Rolle der Prostaglandinproduktion in afrikanischen Trypanosomen: Charakterisierung des Effektes von Prostaglandin D₂ und seiner Metabolite auf die Blutform *Trypanosoma brucei*. Dissertation Universität Tübingen **2005**, S. 4.

35. McKeever, C., Kaiser, M., Rozas, I.: Aminoalkyl derivatives of guanidine diaromatic minor groove binders with antiprotozoal activity. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 700-711.

36. DNDi: Human african trypanosomiasis. <http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/hat/current-treatment> (abgerufen am 08.04.2013).

37. Kennedy, P. G. E.: Clinical features, diagnosis, and treatment of human african trypanosomiasis (sleeping sickness). *Lancet Neurol.* **2013**, 12, S. 186-194.
38. Jacobs, R. T., Nare, B., Wring, S. A., Orr, M. D., Chen, D., Sligar, J. M., Jenks, M. X., Noe, R. A., Bowling, T. S., Mercer, L. T., Rewerts, C., Gaukel, E., Owens, J., Parham, R., Randolph, R., Beaudet, B., Bacchi, C. J., Yarlett, N., Plattner, J. J., Freund, Y., Ding, C., Akama, T., Zhang, Y.-K., Brun, R., Kaiser, M., Scandale, I., Don, R.: SCYX-7158, an orally-active benzoxaborole for the treatment of stage 2 human african trypanosomiasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, 5, e1151.
39. Torreele, E., Bourdin Trunz, B., Tweats, D., Kaiser, M., Brun, R., Mazué, G., Bray, M. A., Pécou, B.: Fexinidazole - a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2010**, 4, e923.
40. Bahia, M. T., Mayer de Andrade, I., Fontes Martins, T. A., da Silva do Nascimento, Á. F., de Figueiredo Diniz, L., Caldas, I. S., Talvani, A., Bourdin Trunz, B., Torreele, E., Ribeiro, I.: Fexinidazole: a potential new drug candidate for chagas disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, 6, e1870.
41. Hong, Y., Kinoshita, T.: Trypanosome glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. *Korean J. Parasitol.* **2009**, 47, 197-204.
42. Abedo, J. A., Jonah, A. O., Mazadu, M. R., Abdullahi, R. S., Idris, H. Y., Shettima, F. T., Mohammed, H., Ombugadu, S., Garba, J., Daudu, M., Kugu, B. A., Abdulamilik, U.: *In vitro*, *in vivo* and phytochemical screening, of extracts of piper guineense for trypanocidal activities against *Trypanosoma brucei brucei*. *Int. J. Biol.* **2013**, 5, 85-90.
43. Ezeokonkwo, R. C., Ezech, I. O., Iheagwam, C. N., Agu, W. E., Agbede, R. I. S.: Efficacy of Kelamidium in the prevention and treatment of *Trypanosoma brucei brucei* infection in albino rats. *Comp. Clin. Pathol.* **2013**, 22, 219-226.
44. Li, S.-Q., Luckins, A., Lun, Z.-R.: *Trypanosoma brucei brucei*: A comparison of gene expression in the liver and spleen of infected mice utilizing cDNA microarray technology. *Exp. Parasitol.* **2011**, 128, 256-264.
45. Oza, S. L., Chen, S., Wyllie, S., Coward, J. K., Fairlamb, A. H.: ATP-dependent ligases in trypanothione biosynthesis - kinetics of catalysis and inhibition by phosphinic acid pseudopeptides. *FEBS Journal* **2008**, 275, 5408-5421.
46. Spinks, D., Torrie, L. S., Thompson, S., Harrison, J. R., Frearson, J. A., Read, K. D., Fairlamb, A. H., Wyatt, P. G., Gilbert, I. H.: Design, synthesis and biological evaluation of *Trypanosoma brucei* trypanothione synthetase inhibitors. *ChemMedChem* **2012**, 7, 95-106.
47. Koch, O., Jäger, T., Flohé, L., Selzer, P. M., Beig, M., Oellien, F., Krauth-Siegel, R. L.: 1. Inhibition of trypanothione synthetase as a therapeutic concept. 2.

Screening approaches towards trypanothione reductase. In: *Drug discovery in infectious diseases (Volume 4): Trypanosomatid diseases. Molecular routes to drug discovery*. Selzer, P. M. (Series Editor). 1. Aufl., **2013**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, S. 388, 429 ff.

48. Krauth-Siegel, R. L., Leroux, A. E.: Low-molecular-mass antioxidants in parasites. *Antioxid. Redox. Signal.* **2012**, 17, 583-607.

49. Oza, S. L., Tetaud, E., Ariyanayagam, M. R., Warnon, S. S., Fairlamb, A. H.: A single enzyme catalyses formation of trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 35853-35861.

50. Krauth-Siegel, R. L., Meiering, S. K., Schmidt, H.: The parasite-specific trypanothione metabolism of *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Biol. Chem.* **2003**, 384, 539-549.

51. Sichhart, Y., Dräger, B.: Immunolocalisation of spermidine synthase in *Solanum tuberosum*. *Phytochem.* **2013**, 91, 117-121.

52. Merkel, P.: Isolierung und Identifizierung der hauptaktiven antitrypanosomalen Komponente des Viperngiftes von *Eristocophis macmahoni* und ihre Effekte auf *Trypanosoma brucei*. Dissertation Universität Tübingen, **2007**, S. 13-15.

53. Flohé, L.: The trypanothione system and its implications in the therapy of trypanosomatid diseases. *Int. J. Med. Microbiol.* **2012**, 302, 216-220.

54. Comini, M. A., Menge, U., Flohé, L.: Biosynthesis of trypanothione in *Trypanosoma brucei brucei*. *Biol. Chem.* **2003**, 384, 653-656.

55. Henderson, G. B., Yamaguchi, M., Novoa, L., Fairlamb, A. H., Cerami, A.: Biosynthesis of the trypanosomatid metabolite trypanothione: purification and characterization of trypanothione synthetase from *Crithidia fasciculata*. *Biochemistry* **1990**, 29, 3924-3929.

56. Flohé, L.: In search of trypanocidal drugs. In: *Antiparasitic and antibacterial drug discovery (1): Drug discovery in infectious diseases: From molecular targets to drug candidates*. Selzer, P. M. (Series Editor). **2009**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, S. 211 ff.

57. Fyfe, P. K., Oza, S. L., Fairlamb, A. H., Hunter, W. N.: *Leishmania* trypanothione synthetase-amidase structure reveals a basis for regulation of conflicting synthetic and hydrolytic activities. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 17672-17680.

58. Oza, S. L., Wyllie, S., Fairlamb, A. H.: Mapping the functional synthetase domain of trypanothione synthetase from *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2006**, 149, 117-120.

59. Oza, S. L., Ariyanayagam, M. R., Aitcheson, N., Fairlamb, A. H.: Properties of trypanothione synthetase from *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2003**, 131, 25-33.
60. Flohé, L.: The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases. *Biotechnol. Adv.* **2012**, 30, 294-301.
61. Fairlamb, A. H., Henderson, G. B., Cerami, A.: The biosynthesis of trypanothione and N^1 -glutathionylspermidine in *Crithidia fasciculata*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1986**, 21, 247-257.
62. Comini, M. A., Guerrero, S. A., Haile, S., Menge, U., Lünsdorf, H., Flohé, L.: Validation of *Trypanosoma brucei* trypanothione synthetase as drug target. *Free Rad. Bio. Med.* **2004**, 36, 1289-1302.
63. Oza, S. L., Shaw, M. P., Wyllie, S., Fairlamb, A. H.: Trypanothione biosynthesis in *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2005**, 139, 107-116.
64. Klebe, G.: Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen. 2. Aufl., **2009**, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S.1.
65. Lipinsky, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J.: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, 46, 3-26.
66. Klebe, G.: Wirkstoffdesign, Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen. 2. Aufl., **2009**, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 1-2.
67. Huggins, D. J., Sherman, W., Tidor, B.: Rational approaches to improving selectivity in drug design. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 1424-1444.
68. Bollinger, J. M., Kwon, D. S., Huisman, G. W., Kolter, R., Walsh, C. T.: Glutathionylspermidine metabolism in *Escherichia coli*. Purification, cloning, overproduction, and characterization of a bifunctional glutathionylspermidine synthetase/amidase. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 14031-14041.
69. Pai, C.-H., Chiang, B.-Y., Ko, T.-P., Chou, C.-C., Chong, C.-M., Yen, F.-J., Chen, S., Coward, J. K., Wang, A. H.-J., Lin, C.-H.: Dual binding sites for translocation catalysis by *Escherichia coli* glutathionylspermidine synthetase. *EMBO J.* **2006**, 25, 5970-5982.
70. Singh, B. K., Sarkar, N., Dubey, V. K.: Modeled structure of trypanothione synthetase of *Leishmania infantum* for the development of novel therapeutics for leishmaniasis. *Curr. Trends Biotech. Pharm.* **2008**, 2, 390-395.
71. Koch, O., Cappel, D., Nocker, M., Jäger, T., Flohé, L., Sotriffer, C. A., Selzer, P. M.: Molecular dynamics reveal binding mode of glutathionylspermidine by trypanothione synthetase. *PLoS ONE* **2013**, 8, e56788.

72. Comini, M., Menge, U., Wissing, J., Flohé, L.: Trypanothione synthesis in *Crithidia* revisited. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 6850-6860.
73. Amsson, K., Oza, S. L., Ravaschino, E., Yamani, A., Lambeir, A.-M., Rajan, P., Bal, G., Rodriguez, J. B., Fairlamb, A. H., Augustyns, K., Haemers, A.: Glutathion-like tripeptides as inhibitors of glutathionylspermidin synthetase. Part 1: Substitution of the glycine carboxylic acid group. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 2553-2556.
74. Ravaschino, E. L., Docampo, R., Rodrigues, J. B.: Design, synthesis, and biological evaluation of phosphinopeptides against *Trypanosoma cruzi* targeting trypanothione biosynthesis. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 426-435.
75. Saudagar, P., Dubey, V. K.: Cloning, expression, characterization and inhibition studies on trypanothione synthetase, a drug target enzyme, from *Leishmania donovani*. *Biol. Chem.* **2011**, 392, 1113-1122.
76. Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Leost, M., Senderowicz, A. M., Lahusen, T., Kunick, C., Meijer, L., Sausville, E. A.: Discovery and initial characterization of the paullones, a novel class of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Cancer Res.* **1999**, 59, 2566-2569.
77. Stuhlmann, F., Jäger, T., Flohé, L., Schinzer, D.: *N*⁶-Substituted benzo[2,3]-azepino[4,5-*b*]indol-6-ones for treatment of tropical diseases. EP 1 757 607 A1, **2005**.
78. Jäger, T., Koch, O., Flohé, L., Selzer, P. M.: Inhibition of trypanothione synthetase as a therapeutic concept. In: *Drug discovery in infectious diseases (4): Trypanosomatid diseases. Molecular routes to drug discovery*. Selzer, P. M. (Series Editor). **2013**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, S. 438.
79. Khan, K. M., Rasheed, M., Ullah, Z., Hayat, S., Kaukab, F., Choudhary, M. I., Rahman, A., Perveen, S.: Synthesis and *in vitro* leishmanicidal activity of some hydrazides and their analogues. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 1381-1387.
80. Oza, K. K., Patel, H. S.: Antimicrobial activity of novel 3-substituted-5-(pyridine-4-yl)-3*H*-1,3,4-oxadiazole-2-thione derivatives. *Bulg. Chem. Commun.* **2010**, 42, 103-106.
81. Derappe, C.: Oxadiazole derivatives and process for preparing same. US 3585209, **1971**.
82. Reichwald, C. J.: Eine neue Variante der Heck-Reaktion zur Darstellung antileishmanieller Paullone. Dissertation Technische Universität Braunschweig, **2008**, S.151 ff.
83. Sattlegger, M., Buschmann, H., Przewosny, M., Englberger, W., Koegel, B.-Y., Schick, H.: Substituted benzo[*b*]azepin-2-one compounds. US 2004/0224938 A1, **2004**.

84. Kunick, C.: Synthese von 7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6-(5*H*)-onen und 6,11-Dihydrothieno-[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-(4*H*)-on. *Arch. Pharm.* **1992**, 325, 297-299.
85. Tolle, N. C.: 1-Benzazepinone mit neuartiger, heterozyklischer *d*-Anellierung als Proteinkinase-Inhibitoren: Synthese und biologische Charakterisierung. Dissertation Technische Universität Braunschweig, **2011**, S.198-199.
86. Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B.: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. 7. überarbeitete Aufl., **2005**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 242 ff.
87. Budzikiewicz, H., Schäfer, M.: Massenspektrometrie. 5. Aufl., **2005**, Wiley-VCH, Weinheim, S. 75-81.
88. Rücker, G., Neugebauer, M., Willems, G. G.: Instrumentelle Analytik für Pharmazeuten: Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysemethoden. 4. Aufl., **2008**, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, Stuttgart, S. 309 ff.
89. Schultz, C.: Antitumoraktive [*d*]-annellierte [1]Benzazepin-2-one. Dissertation Universität Hamburg, **1999**, S. 65-68.
90. Becker, A. C.: Untersuchungen zur Synthese und biologischen Aktivität von neuen Inhibitoren NAD⁺-abhängiger Enzyme aus Paullonen. Dissertation Technische Universität Braunschweig, **2009**, S. 34-37.
91. Becker, A. C.: Untersuchungen zur Synthese und biologischen Aktivität von neuen Inhibitoren NAD⁺-abhängiger Enzyme aus Paullonen. Dissertation Technische Universität Braunschweig, **2009**, S. 37-39.
92. Schultz, C.: Antitumoraktive [*d*]-annellierte [1]Benzazepin-2-one. Dissertation Universität Hamburg, **1999**, S. 80-83.
93. Kunick, C.: Synthese und konformative Flexibilität von 4,9-Dihydroindolo[3,2-*d*][1,2,4]triazolo[4,3-*a*][1]benzazepinen. *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 1141-1143.
94. Amir, M., Shikha, K.: Synthesis and anti-inflammatory, analgesic, ulcerogenic and lipid peroxidation activities of some new 2-[(2,6-dichloroanilino)phenyl]acetic acid derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, 39, 535-545.
95. Kudelko, A.: The synthesis of bis(1,3,4-oxadiazol-2-yl-phenylmethyl)sulfides and other related 1,3,4-oxadiazoles from 1,1'-diphenylthiodiacetic acid dihydrazide and triethyl orthoesters. *Tetrahedron* **2011**, 67, 8502-8508.
96. Brozewicz, K., Slawinski, J.: Synthesis and in vitro activity of novel 2-(benzylthio)-4-chloro-5-(1,3,4-oxadiazol-2-yl)benzensulfonamide derivatives. *Monatsh. Chem.* **2012**, 143, 975-984.

97. Universität Duisburg-Essen: Ringvorlesung "Chemisch Biologische Synthese" http://www.uni-due.de/~bc0084/ak_schrader/Vorlesungen/Ringkommentiert.pdf (abgerufen am 04.06.2013).
98. Chung, H., Kang, Y., Kweon, D. H., Lee, W.: Synthesis of 1-[(pyrazol-3-yl)methyl]pyridazin-6-ones. *J. Heterocycl. Chem.* **2000**, 37, 1443-1446.
99. Kim, J.-H., Heo, J.-N.: Alkylation of 4,5-dichloropyridazin-6-one with α,ω -dibromoalkanes or 4,5-dichloro-1-(ω -bromoalkyl)pyridazin-6-ones. *J. Heterocycl. Chem.* **1997**, 34, 209-214.
100. Choi, H. Y., Chi, D. Y.: Nonselective bromination-selective debromination strategy: selective bromination of unsymmetrical ketones on singly activated carbon against doubly activated carbon. *Org. Lett.* **2003**, 5, 411-414.
101. Makosza, M.: Phase-transfer catalysis. A general green methodology in organic synthesis. *Pure Appl. Chem.* **2000**, 72, 1399-1403.
102. Yano, S., Kazuno, H., Suzuki, N., Emura, T., Wierzba, K., Yamashita, J., Yamada, Y., Fukushima, M., Asao, T.: Synthesis and evaluation of 6-methylene-bridges uracil derivatives. Part 1: Discovery of novel orally active inhibitors of human thymidine phosphorylase. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 3431-3441.
103. Chafeev, M., Chowdhury, S., Fraser, L., Fu, J., Langille, J., Liu, S., Sun, J., Sviridov, S., Wood, M., Zenova, A. Y., Jia, Q., Cadieux, J.-J., Gauthier, S. J., Douglas, A. F., Hsieh, T., Chakka, N., Cikojevic, Z.: Spiro-oxindole compounds and their uses as therapeutic agents. US 2012/0295897 A1, **2012**.
104. Johnson, T., Tanis, S. P., Butler, S. L., Dalvie, D., DeLisle, D. M., Dress, K. R., Flahive, E. J., Hu, Q., Kuehler, J. E., Kuki, A., Liu, W., McClellan, G. A., Peng, Q., Plewe, M. B., Richardson, P. F., Smith, G. L., Solowiej, J., Tran, K. T., Wang, H., Yu, X., Zhang, J., Zhu, H.: Design and synthesis of novel *N*-hydroxy-dihydronaphththyridinones as potent and orally bioavailable HIV-1 integrase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 3393-3417.
105. Wee, A., Shu, A., Bunnenberg, E., Djerassi, C.: Magnetic circular dichroism studies. 66. Synthesis of dimethyl monosubstituted porphyrins. The effect of substituent conformation on the magnetic circular dichroism spectra of ethoxycarbonyl porphyrins. *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 3327-3337.
106. Anderson, C., Loader, R., Xu, R., Gogan, N., McDonald, R., Edwards, L.: Pyrrole chemistry. XXVIII. Substitution reactions of 1-(phenylsulfonyl)pyrrole and some derivatives. *Can. J. Chem.* **1985**, 63, 896-902.
107. Mironov, A. F., Kharitonova, O. V., Efimkin, A. G., Solomentseva, T. A.: New iodo- and nitrosubstituted pyrroles. *Russ. J. Org. Chem.* **2005**, 41, 1654-1656.

108. Dahrough, M. R., Jara, P., Mendez, L., Portilla, Y., Abril, D., Alfonso, G., Chavez, I., Manriquez, J.: An effective and selective route to 1,5-dihdropolyalkylated s-indacenes: characterization of their mono- and dianions by silylation. Structure of *trans*-1,5-bis(trimethylsilyl)-2,6-diethyl-4,8-dimethyl-s-indacene. *Organometallics* **2001**, 20, 5591-5597.
109. Nesterov, V. V., Kolodiaznyi, O. I.: Efficient method for the asymmetric reduction of α - and β -ketophosphonates. *Tetrahedron* **2007**, 63, 6720-6731.
110. Zinic, M., Kuftinec, J., Hofman, H., Kajfez, F.: Selective decarboxylation of ethyl-1,4-dimethyl-3-(ethoxycarbonyl)-1*H*-pyrrole-2-acetate in 85% phosphoric acid. *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 697-700.
111. Becker, H., Berger, W., Domschke, G., Fanghänel, E., Faust, J., Fischer, M., Gentz, F., Gewald, K., Gluch, R., Mayer, R., Müller, K., Pavel, D., Schmidt, H., Schollberg, K., Schwetlick, K., Seiler, E., Zeppenfeld, G.: Organikum 22. Aufl., **2004**, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim S. 223-226.
112. Sieuwerts, A. M., Klijn, J. G. M., Peters, H. A., Foekens, J. A.: The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC₅₀-values and cell survival. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1995**, 33, 813-823.
113. Muelas-Serrano, S., Nogal-Ruiz, J. J., Gómez-Barrio, A.: Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol. Res.* **2000**, 86, 999-1002.
114. Lindl, T., Gstraunthaler, G.: Zell- und Gewebeskultur. Von den Grundlagen zur Laborbank. 6. Aufl., **2008**, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 156-157.
115. Haynes, J. L.: Principles of flow cytometry. *Cytometry Suppl.* **1988**, 3, 7-17.
116. Mandy, F. F., Bergeron, M., Minkus, T.: Principles of flow cytometry. *Transfus. Sci.* **1995**, 16, 303-314.
117. Einführung in die Durchflusszytometrie. <http://www.uni-konstanz.de/FuF/Bio/research/Arbeitsgruppen/Groettrup/Homepage/Skripte/Teaching/Flow%20cytometry.pdf> (abgerufen am 09.09.2013).
118. Baykov, A. A., Evtushenko, O. A., Avaeva, S. M.: A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal. Biochem.* **1988**, 171, 266-270.
119. Itaya, K., Ui, M.: A new micromethod for the colorimetric determination of inorganic phosphate. *Clin. Chim. Acta* **1966**, 14, 361-366.
120. Feng, J., Chen, Y., Pu, J., Yang, X., Zhang, C., Zhu, S., Zhao, Y., Yuan, Y., Yuan, H., Liao, F.: An improved malachite green assay of phosphate: mechanism and application. *Anal. Biochem.* **2011**, 409, 144-149.

121. Koch, O.: What makes the difference? A computational approach to explain varying paullone inhibition activity on trypanothione synthetase from different species. Präsentation im Rahmen des 10th Drug Design and Development Seminars, Schloss Rauischholzhausen, Deutschland, (02.2009).
122. Introduction to the data analysis of the Roche xCELLigence™ System with RTCA package. <http://www.bioconductor.org/packages/2.12/bioc/vignettes/RTCA/inst/doc/aboutRTCA.pdf> (abgerufen am 08.07.2013).
123. Roche: xCELLigence: Label-free, real-time cell monitoring technology. http://genome.hku.hk/portal/files/GRC/Events/Seminars/2008/20080829/xCELLigence_APAC_RoadShow_by_Kok_Long.pdf (abgerufen am 08.07.2013).
124. Castro, H.: Determination of IC₅₀ for FS554 towards the recombinant His-tagged *L. infantum* TryS. *Bisher unpubliziert*.
125. Amarego, W. L. F., Chai, C. L. L.: Purification of laboratory chemicals. 5. Aufl., **2003**, MPG Books, Bodmin, Cornwall, S. 157, 198, 361, 370.
126. Weislow, O. S., Kiser, R., Fine, D. L., Bader, J., Shoemaker, R. H., Boyd, M. R.: New soluble-formazan assay for HIV-1 cytopathic effects: application to high-flux screening of synthetic and natural products for AIDS-antiviral activity. *J. Natl. Cancer Inst.* **1989**, 81, 577-586.
127. Rapoport, R., Willson, C. D.: Synthesis of pyrrole-3-carboxylic acids. *J. Org. Chem.* **1960**, 26, 1102-1104.
128. Biebinger, S., Wirtz, L. E., Lorenz, P., Clayton, C.: Vectors for inducible expression of toxic gene products in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1997**, 85, 99-112.
129. Hirumi, H., Hirumi, K.: Continuous cultivation of *Trypanosoma brucei* blood stream forms in a medium containing at low concentration of serum protein without feeder cell layers. *J. Parasitol.* **1989**, 75, 985-989.
130. Peacock, C. S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J. C., Quail, M. A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., Kerhornou, A., Ivens, A., Fraser, A., Rajandream, M.-A., Carver, T., Norbertczak, H., Chillingworth, T., Hance, Z., Jagels, K., Moule, S., Ormond, D., Rutter, S., Squares, R., Whitehead, S., Rabinowitsch, E., Arrowsmith, C., White, B., Thurston, S., Bringaud, F., Baldauf, S. L., Faulconbridge, A., Jeffares, D., Depledge, D. P., Oyola, S. O., Hilley, J. D., Brito, L. O., Tosi, L. R. O., Barrell, B., Cruz, A. K., Mottram, J. C., Smith, D. F., Berriman, M.: Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat. Genet.* **2007**, 39, 839-847.
131. Krauth-Siegel, R. L., Comini, M. A.: Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, 1780, 1236-1248.

132. Taylor, M. C., Kaur, H., Blessington, B., Lelly, J. M., Wilkinson, S. R.: Validation of spermidine synthase as drug target in african trypanosomes. *Biochem. J.* **2008**, 409, 563-569.
133. Reguera, R. M., Balana-Fouce, R., Showalter, M., Hickerson, S., Beverly, S. M.: *Leishmania major* lacking arginase (ARG) are auxotrophic for polyamines but retain infectivity to susceptible BALB/c mice. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2009**, 165, 48-56.
134. Ariyanayagam, M. R., Fairlamb, A. H.: Diamine auxotrophy may be a universal feature of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1997**, 84, 111-121.

Anhang

Gefahrstoffverzeichnis

Alle verwendeten Chemikalien und Gefahrstoffe sind unter Beachtung der Gefahren- und Sicherheitshinweise (H- und P-Sätze, *hazard and precautionary statements*) zu handhaben. Bei den im Folgenden aufgeführten Chemikalien sind besondere Gefahren zu beachten. Die Kennzeichnung und Einstufung der Substanzen richtet sich nach der CLP-Verordnung (*Regulation on Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures*-Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen).

Anilin und Derivate

Gefahrenpiktogramme: GHS05, GHS06, GHS08, GHS09

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweise: H301: Giftig beim Verschlucken; H311: Giftig bei Hautkontakt; H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen; H318: Verursacht schwere Augenschäden; H331: Giftig beim Einatmen; H341: Kann vermutlich genetische Defekte verursachen; H351: Kann vermutlich Krebs erzeugen; H372: Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition; H400: Sehr giftig für Wasserorganismen.

Sicherheitshinweise: P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden; P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen; P308+P313: Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen; P302+P352: Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen; P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter

spülen; P309+P310: Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

Benzylamin

Gefahrenpiktogramme: GHS05, GHS07

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweise: H302+H312: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Hautkontakt; H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

Sicherheitshinweise: P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen; P301+P330+P331: Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen; P302+P352: Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen; P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen; P309+P310: Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

Brom

Gefahrenpiktogramme: GHS05, GHS06, GHS09

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweise: H330: Lebensgefahr beim Einatmen; H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden; H400: Sehr giftig für Wasserorganismen.

Sicherheitshinweise: P210: Vor Hitze schützen; P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden; P304+P340: Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert; P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen; P309+P310: Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen; P403+P233: Behälter dicht verschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.

Chlorwasserstoff (g)

Gefahrenpiktogramme: GHS04, GHS05, GHS06

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweise: H331: Giftig beim Einatmen; H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden; H280: Enthält Gas unter Druck, kann bei Erwärmung explodieren; EUH071: Wirkt ätzend auf die Atemwege.

Sicherheitshinweise: P260: Gas/Dampf nicht einatmen; P280: Schutzhandschuhe/ Schutzbekleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen; P304+P340+P315: Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert. Sofort ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen; P303+P361+P353+P315: Bei Kontakt mit der Haut (oder dem Haar): Alle verschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen. Sofort ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen; P305+P351+P338+P315: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Sofort ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen; P405: Unter Verschluss aufbewahren; P403: An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.

Dichlormethan

Gefahrenpiktogramme: GHS08

Signalwort: Achtung

Gefahrenhinweise: H351: Kann vermutlich Krebs erzeugen.

Sicherheitshinweise: P260: Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen; P281: Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung; P308+P313: Bei Exposition oder falls betroffen: ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

N,N-Dimethylformamid

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS07, GHS08

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweise: H226: Flüssigkeit und Dampf entzündbar; H312: Gesundheitsschädlich beim Hautkontakt; H319: Verursacht schwere Augenreizung; H332: Gesundheitsschädlich bei Einatmen; H360D: Kann das Kind im Mutterleib schädigen.

Sicherheitshinweise: P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen; P210: Von Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen; P301+P310: Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen; P302+P352: Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen; P304+P340: Bei Einatmen: an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert; P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

1-Methylpiperazin

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS05, GHS07

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweise: H226: Flüssigkeit und Dampf entzündbar; H290: Kann gegenüber Metallen korrosiv sein; H312: Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt; H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

Sicherheitshinweise: P210: Vor Hitze schützen; P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen; P301+P330+P331: Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen; P302+P352: Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen; P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen; P309+P310: Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

Piperidin

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS05, GHS06

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweis: H225: Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar; H311: Giftig beim Hautkontakt; H331: Giftig beim Einatmen; H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

Sicherheitshinweise: P210: Vor Hitze schützen; P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen; P301+P330+P331: Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen; P302+P352: Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen; P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den

Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen; P309+P310: Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

Pyrrolidin

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS05, GHS07

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweis: H225: Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar; H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden; H332: Gesundheitsschädlich beim Einatmen.

Sicherheitshinweise: P210: Vor Hitze schützen; P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen; P301+P330+P331: Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen; P304+P340: Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert; P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen; P310: Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

Tetrachlorkohlenstoff

Gefahrenpiktogramme: GHS06, GHS07

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweis: H351: Kann vermutlich Krebs erzeugen; H331: Giftig bei Einatmen; H301: Giftig bei Verschlucken; H311: Giftig bei Hautkontakt; H372: Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition; H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung; H420: Schädigt die öffentliche Gesundheit und die Umwelt durch Ozonabbau in der äußeren Atmosphäre.

Sicherheitshinweise: P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden; P281: Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden; P314: Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Tetrahydrofuran

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS07

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweis: H225+EUH019: Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. Kann explosionsfähige Peroxide bilden; H319: Verursacht schwere Augenreizungen; H335: Kann die Atemwege reizen.

Sicherheitshinweise: P210: Vor Hitze schützen; P233: Behälter dicht verschlossen halten; P243: Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladung treffen; P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

Danksagung

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung danke ich für die finanzielle Förderung im Rahmen des Projektes „Strukturbasiertes Design trypanozider Wirkstoffe“.

Die biologischen Untersuchungen an *T. b. brucei* und den Trypanothion-synthetasen sowie die Expression dieser Enzyme in *E. coli* wurden von Herrn D. Benítez, Herrn D. Charquero und Herrn M. A. Comini aus der Gruppe *Redox Biology of Trypanosomes* des Instituts Pasteur de Montevideo in Uruguay durchgeführt. Für die Durchführung der Versuche und die gelungene Zusammenarbeit möchte ich mich an dieser Stelle bedanken! Die Zytotoxizitätsuntersuchungen an Mausmakrophagen und die Messungen an *T. cruzi* wurden von Frau M. Abad Dar, Frau H. Erdmann und Herrn C. Hölscher aus der Forschungsgruppe Infektionsimmunologie des Forschungszentrums in Borstel übernommen. Vielen Dank dafür. Herrn Oliver Koch danke ich für die Erstellungen von *docking*-Posen und deren Darstellung.

Ich möchte mich bei Frau Dr. Ibrom sowie Frau Holba-Schulz aus den NMR-Laboratorien der Chemischen Institute der TU Braunschweig für die Aufnahme der NMR-Spektren bedanken. Herrn Dr. Papke, Frau Döring und Frau Mlynek aus dem Massenspektrometrie-Laboratorium der Chemischen Institute der TU Braunschweig danke ich für die Erstellung der Massenspektren und der in dieser Arbeit verwendeten Bilder. Den Mitarbeiterinnen der Analytischen Abteilung des Instituts für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig Frau Babic, Frau Meyer und Frau Reich gilt mein Dank für die Probenvorbereitung der NMR-Experimente, die Durchführung der Elementaranalysen und die Aufnahme der IR-Spektren.

Bei Daniela Grimm und Britta Thomas möchte ich mich an dieser Stelle für die Übernahme aller organisatorischen und verwaltungstechnischen Aufgaben bedanken. Bei den Mitarbeitern Klaus Hartmann und Matthias Söchtig möchte ich mich herzlich für die Versorgung mit Chemikalien, Glasgeräten, Kaffeemaschinen und aktuellen institutsinternen Informationen bedanken. Klaus Hartmann danke ich insbesondere für die Instandhaltung der Funktionstüchtigkeit meines Computers. Bei Matthias Söchtig möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit im Praktikumsbetrieb bedanken. Eduard Hinz danke ich für die kreative Umsetzung meiner Ideen bezüglich Inneneinrichtungen und der Instandhaltung der Pumpen. Frank Roese danke ich für die technische Unterstützung und die ungezwungene Atmosphäre.

Den ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeitern meines Arbeitskreises Nadine Tolle, Renate Helmer (geb. Determann), Jasmin Ryczak, Annette Lader, Hannes Falke, Franziska Maiwald, Sebastian Wölfel, Anne Walter, Laura Schlütke, Duc Hoàng Lande und Andreas Masch danke ich für die Zusammenarbeit und die fachlichen Diskussionen. Renate Helmer und Annette Lader danke ich für die Einarbeitung und Hilfestellungen im Praktikumsbetrieb. Bei Renate Helmer möchte ich mich außerdem für die Einführung im Umgang mit der HPLC-Anlage bedanken. Meinen wissenschaftlichen Hilfskräften Andreas Masch und Mareike Cohrs danke ich für die tatkräftige Unterstützung im Labor.

Besonders dankbar bin ich Franziska Maiwald für ein stets freundliches und ungezwungenes Laborklima, die gute Zusammenarbeit und viele Infos über unnützes Wissen. Danke auch für die fachlichen Gespräche, Anregungen und Ideen und das schnelle Korrekturlesen. Die gemeinsame Laborzeit war mit viel Freude verbunden.

Sehr dankbar bin ich auch Renate Buß und Hannes Falke für die rekordverdächtig schnelle Hilfe beim Korrekturlesen.

Schließlich gilt mein größter Dank meinem Freund Ronald Buß für die uneingeschränkte Unterstützung und die stetige Motivation. Natürlich wäre das alles nicht ohne morgendlichen Kaffee zu schaffen gewesen.